Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

57. BAND, 3. HEFT

MIT 53 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 9. OKTOBER 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Planta (Berl.)

Preis DM 25.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität,
oder an
Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 83 03 01, Fernschreibnummer 01-83 319
Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61 723

57. Band **Inhaltsverzeichnis** 3. Heft

Seite

Egger, K., und H. Reznik, Die Flavonolglykoside der Hamamelidaceen. Mit 6 Textabbildungen 239

Werz, G., Über die Beeinflussung der Formbildung von *Acetabularia* durch Selenat . . 250

Bayer, M., Über die Aktivierung des Hemmstoffsystems von *Helianthus* durch kurzfristige Belichtung. Mit 1 Textabbildung 258

Franke, W., Tröpfchenausscheidung und Ektodesmenverteilung in Zwiebelschuppenepidermen. Ein Beitrag zur Frage der Ektodesmenfunktion. Mit 19 Textabbildungen 266

Rudolph, H., Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. III. Mitteilung. Mit 9 Textabbildungen 284

Gottschalk, W., Über die mutative Abänderung pflanzlicher Organisationsmerkmale. Mit 7 Textabbildungen 313

Constabel, F., Das Wachstum der *Juniperus communis*-Gewebekulturen in Gegenwart verschiedener Kohlenhydrate, insbesondere von Stärke 331

Klämbt, H.-D., Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. III. Mitteilung. Stoffwechselprodukte der Naphthyl-1-Essigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und der Vergleich mit jenen der Indol-3-Essigsäure und Benzoesäure. Mit 9 Textabbildungen 339

Leh, H.-O., Blütenmißbildungen an Stiefmütterchen durch Phenylborsäure. Mit 2 Textabbildungen 354

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 57, 239—249 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

DIE FLAVONOLGLYKOSIDE DER HAMAMELIDACEEN

Von

KURT EGGER und HANS REZNIK

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1961)

In einer vorangegangenen Veröffentlichung (REZNIK und EGGER 1960) haben wir beide über die Verbreitung der Flavonolaglyca Myricetin, Quercetin und Kaempferol in den Laubblättern von 14 Arten aus acht Gattungen der Hamamelidaceen berichtet und auf die stetige Anwesenheit des Myricetins hingewiesen (Familienmerkmal im Sinne der Chemotaxonomie?). Da diese Flavonolaglyca Hydrolyseprodukte sind, demnach in vivo nicht frei, sondern in glykosidischer Bindung vorliegen, ergänzen wir die vorangegangene Veröffentlichung durch den folgenden Bericht über die in den lebenden Geweben anzutreffenden natürlichen Verbindungen (s. S. 240).

Es treten in analytisch gut nachweisbarer Menge acht Glykoside auf, sechs hiervon bestimmen im wesentlichen das Pigmentmuster der Blätter. Es sind dies die 3-Glucoside des Myricetins (My_1), Quercetins (Q_1) und Kaempferols (K_1) sowie die 3-Rhamnoside des Myricetins (My_2), Quercetins (Q_2) und Kaempferols (K_2). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über diese Verbindungen.

Myricetin-3-glucosid wurde von ROBERTS u. Mitarb. (1956) in Teeblättern und von FEENSTRA (1960) in den violetten Samenschalen von *Phaseolus vulgaris* (Type sh CV, Substanzbez. F 61 f_4) gefunden. My_2, Myricitrin, ist in Betulaceen, Nymphaeaceen und anderen Familien anzutreffen und dort meist — wie nun auch bei den Hamamelidaceen gefunden — mit Quercitrin (Q_2) vergesellschaftet. Von Isoquercitrin ($= Q_1$) sind zahlreiche Vorkommen in Pteridophyten und Angiospermen bekannt. Was nun Astragalin (K_1) betrifft, so wurde dieses Flavonol vorwiegend in Blütenblättern gefunden. Afzelin (K_2) ist nachgewiesen in Holz und Rinde von *Afzelia*-Arten und *Engelhardtia formosana*. Obwohl nur wenige Vorkommen von Afzelin beschrieben sind, dürfte es nach unseren Beobachtungen häufig als Spurensubstanz das Quercitrin begleiten.

Die Verbreitung der Glykoside in den Hamamelidaceen

Die Tabelle 2 gibt die Verbreitung der Flavonolglykoside in den einzelnen Spezies wieder. Die Zahlen bedeuten Milligramm Glykosid in 100 g frischem Blattmaterial. Die Ermittlung des Gehaltes erfolgte

durch chromatographischen Vergleich quantitativer Extrakte mit Testreihen, wobei eine Genauigkeit von $\pm 15\%$ erreicht wird.

Tabelle 1

Abkürzung	identisch mit	R_f Ptr.	R_f Chl_1	R_f Chl_2	Al UV	Zr UV	Bd UV	Bd TL
My_1	Myricetin-3-glucosid . . .	35	07	25	g	org	dbr	ockg
My_2	Myricetin-3-rhamnosid = Myricitrin	48	13	33	g	org	dbr	ockg
Q_1	Quercetin-3-glucosid = Isoquercitrin	48	18	43	ggr	g	dbr	sg
Q_2	Quercetin-3-rhamnosid = Quercitrin	60	24	48	ggr	g	dbr	sg
Q_3	Quercetin-3-rhamnoglucosid = Rutin . . .	37	13	41	ggr	g	dbr	sg
Q_4	Quercetin-4′-glucosid = Spiraeosid	46	15	41	ggr	ggr	g	zg
K_1	Kaempferol-3-glucosid = Astragalin	62	31	54	gr	grg	g	zg
K_2	Kaempferol-3-rhamnosid = Afzelin . . .	73	38	64	gr	grg	g	zg

Die Wanderungswerte sind in $R_f \times 100$ angegeben. Abkürzungen: Ptr. = Partridge-Gemisch, Chl_1 = Chloroform : Eisessig 1 : 1, wassergesättigt, Chl_2 = Chloroform : Eisessig 2 : 3, wassergesättigt; Al = Aluminiumchlorid, Zr = Zirkonoxychlorid, beide in 3%iger methanolischer Lösung, Bd = Benedicts Reagens. g = gelb, gr = grün, or = orange, ock = ocker, d = dunkel, s = satt, z = zitronen.

Tabelle 2. *Verbreitung der Glykoside*

Art	My		Q		K	
	gl	rh	gl	rh	gl	rh
Corylopsis pauciflora S. et Z. . . .	10	50	20	150	10	250
C. platypetala REHD. et WILS. . . .	—	20	10	150	—	50
C. spicata S. et Z.	—	50	20	200	—	50
C. glabrata BENTH.	10	40	20	100	20	200
C. willmotiae REHD. et WILS. . . .	—	20	—	200	—	20
Distilium racemosum S. et Z. . . .	—	10	—	40	—	10
Fothergilla monticola ASHE.	10	—	100	—	20	—
Hamamelis japonica S. et Z.	10	—	40	20	120	20
H. mollis OLIV.	—	—	—	50	80	—
H. vernalis SARG..	10	150	—	60	—	10
H. virginiana L.	10	—	10	—	60	—
Liquidambar styraciflua L..	—	100	—	150	—	10
Parrotia persica C. A. MEY.	—	200	—	20	—	10
Parrotiopsis jaquemontiana REHD. .	—	—	40	—	20	—
Stuartia monadelpha S. et. Z. . . .	—	40	60	80	—	—
Cercidiphyllum japonicum S. et Z .	—	—	—	100	—	—

gl = Glykosid, rh = Rhamnosid

Gibt es bei den Hamamelidaceen gattungsspezifische Pigmentmuster? Betrachten wir Abb. 1. Sie zeigt die Verteilung der Glykoside auf die einzelnen Taxa anschaulicher als Tabelle 1. Wir finden darin die Gattung *Corylopsis* durch ein einheitliches Pigmentmuster, und zwar durch das Überwiegen der 3-Rhamnoside (My_2, Q_2, K_2), gekennzeichnet. Abweichend von dieser Ordnung über ein Genus hinweg verhält sich nun *Hamamelis*, wo Willkür in der Kombination der Glykoside herrscht. Bei den übrigen Gattungen überwiegen teils die Glucoside, teils die Rhamnoside. *Fothergilla* sticht von den anderen Hamamelidaceen durch den Besitz des an sich ubiquitären, bei den Hamamelidaceen sonst aber fehlenden Rutins ab. Insgesamt läßt sich den Befunden entnehmen, daß unter den Glucosiden die Verbindungen des Quercetins und Kaempferols überwiegen, während Myricetin-3-glucosid stark zurücktritt. Beiden Rhamnosiden folgt das Mengenverhältnis der Beziehung:

$$Q > My > K.$$

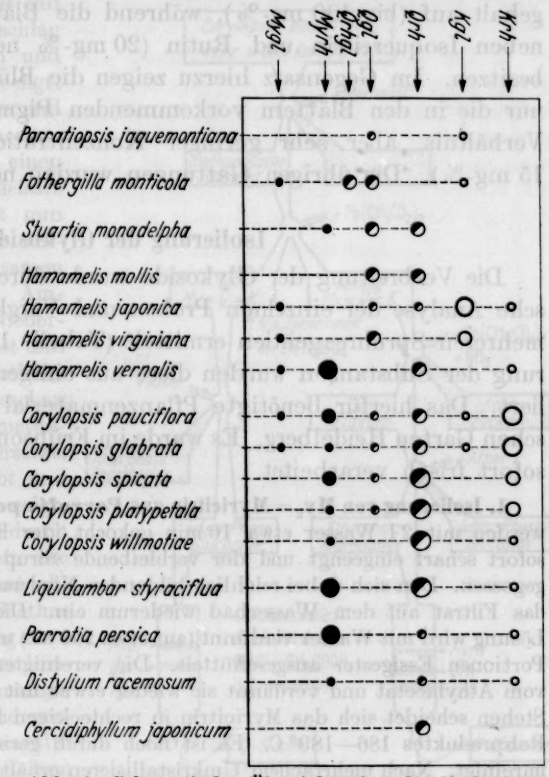


Abb. 1. Schematische Übersicht über die Verbreitung der Glykoside in Laubblättern der Hamamelidaceen. Abkürzungen: *My* Myricetin; *Q* Quercetin; *K* Kaempferol; *gl*-glucosid; *rh*-rhamnosid. Größe der Kreise = relative Menge; schwarz: My-glykoside, schwarz-weiß: Q-glykoside, weiß: K-glykoside

Schon in frisch entfalteten Blättern erreicht der Flavonolspiegel nahezu den Sättigungswert. Im Herbstlaub häufen sich daneben größere Mengen von Gerbstoffen an, was die Isolierung erschwert.

In den meisten bekannt gewordenen Fällen weichen die Pigmentmuster der Blütenteile von denen der zugehörigen Laubblätter erheblich ab. Das gilt bei den Hamamelidaceen auch für die Gattungen *Hamamelis* und *Fothergilla*. Die Petalen der in Tabelle 1 aufgeführten *Hamamelis*-Arten enthalten das Quercetin-4′-glucosid, das Spiraeosid. Es wurde von Hörhammer u. Mitarb. aus Blüten von *H. japonica* isoliert

und von uns auch in den übrigen *Hamamelis*-Arten nachgewiesen. Daneben gibt es in den Blüten noch reichlich Quercetin- und Kaempferolrhamnoside und im Falle rot gefärbter Petalen Malvidinglykoside. Myricetinglykoside sind nur in Spuren vorhanden. Die männlichen Inflorescenzen von *Fothergilla monticola* weisen einen hohen Astragalingehalt auf (bis 100 mg-%), während die Blätter nur geringe Mengen neben Isoquercitrin und Rutin (20 mg-% neben 120 und 40 mg-%) besitzen. Im Gegensatz hierzu zeigen die Blüten der *Corylopsis*-Arten nur die in den Blättern vorkommenden Pigmente zwar im nämlichen Verhältnis, aber sehr geringer Konzentration (Gesamtflavon unter 15 mg-%). Die übrigen Gattungen wurden noch nicht untersucht.

Isolierung der Glykoside

Die Verbreitung der Glykoside wurde durch papierchromatographische Analyse der einzelnen Proben und Vergleich der Reaktionen mit mehreren Sprühreagentien ermittelt (Tabelle 1 und 2). Zur Identifizierung der Substanzen wurden diese aus einigen geeigneten Quellen isoliert. Das hierfür benötigte Pflanzenmaterial entstammt dem botanischen Garten Heidelberg. Es wurde im Frühsommer geerntet und jeweils sofort frisch verarbeitet.

1. Isolierung von My_2 = Myricitrin aus *Parrotia persica*. 250 g frische Blätter werden mit 2 l Wasser etwa 10 min gekocht, der Extrakt auf offener Flamme sofort scharf eingeengt und der verbleibende Sirup heiß in 0,5 l Methanol eingegossen. Den sich dabei reichlich bildenden Niederschlag verwirft man und engt das Filtrat auf dem Wasserbad wiederum ein. Die so vom Methanol befreite Lösung wird mit Wasser verdünnt (auf etwa 200 ml) und nun mehrfach mit kleinen Portionen Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge befreit man nun vom Äthylacetat und verdünnt sie wieder etwas mit Wasser. Nach mehrtägigem Stehen scheidet sich das Myricitrin in rechteckigen Plättchen ab, Festpunkt des Rohproduktes 186—189° C. Es ist noch durch geringe Mengen Quercitrin verunreinigt. Nach mehrfachem Umkristallisieren erhält man ein Produkt vom Festpunkt 197,5° C. Ausbeute 150 mg, das sind 30% des Gesamtgehaltes.

2. Isolierung von My_2 = Myricitrin aus *Hamamelis vernalis*. In gleicher Weise wie unter (1) wurden aus 100 g frischer Blätter von *Hamamelis vernalis* 50 mg Myricitrin erhalten. Das Produkt ist etwas stärker durch Quercitrin verunreinigt. Festpunkt 185° C.

3. Q_2 = Quercitrin aus *Corylopsis platypetala*. Ebenfalls nach Vorschrift (1) aus 300 g frischen Blättern von *C. platypetala* 200 mg Quercitrin. Nach Umkristallisieren aus verd. Äthanol Festpunkt 176° C.

4. My_2 und Q_2 (Myricitrin und Quercitrin) aus *Liquidambar styraciflua*. Wie oben beschrieben, wurde aus 1 kg frischer Blätter von *L. styraciflua* 1,5 g Mischkristallisat von Quercitrin und Myricitrin + Spuren von Afzelin erhalten. Zur Trennung wurden 5 Portionen des Kristallisats von je 100 mg in wenigen Milliliter Methanol gelöst, mit etwas Chloroform und Eisessig versetzt und auf eine Zellulosesäule (Durchmesser 4 cm, Länge 25 cm) aufgetragen. Man entwickelt nun mit dem Fließmittel Chloroform:Eisessig 3:2, gesättigt mit Wasser, und kontrolliert die Trennung mit der UV-Lampe. Beide Glykoside zeigen kräftige

Absorption. Die Fraktionen werden sodann unter vermindertem Druck eingeengt. Nach mehrtägigem Stehen scheiden sich die Glykoside kristallin ab.

Ausbeute 180 mg Myricitrin, Festpunkt 190° C, und 210 mg Quercitrin vom Festpunkt 178° C.

5. Isolierung von Astragalin = K_1 aus *Hamamelis japonica*. 500 g frische Blätter von *H. japonica* werden mit 3 l Wasser ausgekocht. Den Extrakt engt man scharf ein und versetzt ihn mit 1 l Methanol. Der Niederschlag wird wie bei (1) verworfen und das Filtrat auf 250 ml eingeengt. Man fügt 5 ml Ameisensäure und darauf methanolische Bleiacetatlösung zu, bis die Lösung einen kräftigen Überschuß an Bleisalz enthält. Man zentrifugiert nun vom Niederschlag ab, der verworfen wird. Durch langsamen Zusatz von verdünntem Ammoniak erhält man einen Niederschlag, der reingelb gefärbt ist und das Kaempferolglucosid enthält. Er wird abzentrifugiert, gewaschen und mit soviel verdünnter methanolischer Schwefelsäure versetzt, daß er sich völlig entfärbt und die Lösung saure Reaktion zeigt. Man entfernt das Ungelöste durch Zentrifugieren und stumpft die Lösung mit Bariumkarbonat ab. Nach dem Verdampfen des Methanols wird die wäßrige Lösung etwa 20mal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Man vereinigt die Auszüge, verjagt das Äthylacetat und verdünnt mit Wasser. Das Astragalin scheidet sich beim Stehen in feinen Nädelchen ab. Umkristallisieren aus verdünnter Essigsäure. Ausbeute 220 mg, Festpunkt 177° C.

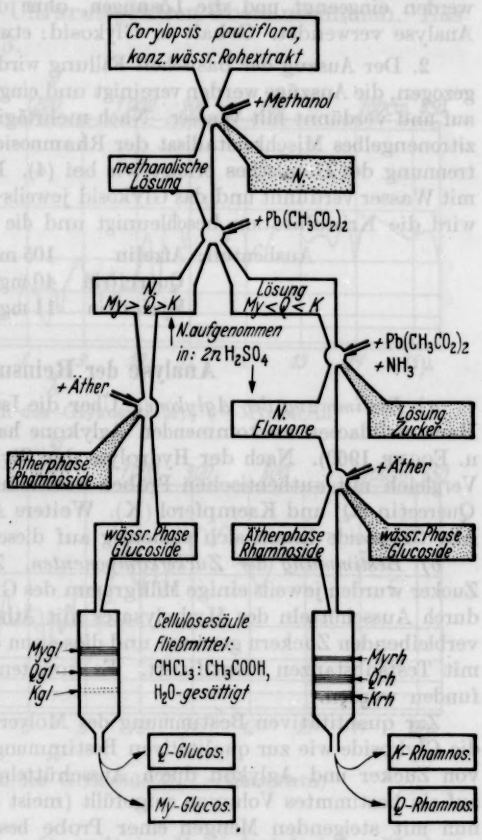


Abb. 2. Trennungsgang der *Corylopsis*-Glykoside, schematisiert. Erläuterungen im Text

6. Isolierung von K_2 = Afzelin aus *Corylopsis pauciflora* (neben Q_2, My_2, Q_1 und My_1). *C. pauciflora* enthält ein Gemisch von 6 Glykosiden. Hauptpigmente sind die Rhamnoside; die Glucoside sind in geringerer Menge vorhanden. Zur Reindarstellung einzelner Komponenten ist daher eine kompliziertere Aufbereitung erforderlich. Leider stand uns von dieser Pflanze nur sehr wenig Rohmaterial zur Verfügung. Die Glucoside konnten nur in Lösung erhalten werden, doch war ihre eindeutige Identifizierung möglich.

Der Trennungsgang ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Nach der Vorschrift (5) wurden neutrale und basische Bleifällungen gewonnen. Die Glykoside von Quercetin und Myricetin sind in der neutralen, die Verbindungen des Kaempferols in der basischen Fällung angereichert.

Nach dem Aufnehmen der Niederschläge mit methanolischer Schwefelsäure wird

1. der Auszug der Neutralfällung durch mehrfaches Ausschütteln mit Äther von den restlichen Rhamnosiden befreit. Die Glucoside verbleiben in der wäßrigen Phase. Diese wird nach dem Neutralisieren eingeengt, in wenig Methanol aufgenommen, mit Chloroform und Eisessig versetzt und wie bei (4) säulenchromatographisch getrennt. Die Fraktionen mit Myricetin-3-glucosid und Isoquercitrin werden eingeengt und die Lösungen, ohne die Kristallisation abzuwarten, zur Analyse verwendet. Gehalt an Glykosid: etwa je 10 mg.

2. Der Auszug der basischen Fällung wird ebenfalls mehrfach mit Äther ausgezogen, die Auszüge werden vereinigt und eingeengt. Man nimmt in wenig Äthanol auf und verdünnt mit Wasser. Nach mehrtägigem Stehen scheidet sich ein helles zitronengelbes Mischkristallisat der Rhamnoside ab. Ausbeute 200 mg. Die Auftrennung des Gemisches erfolgt wie bei (4). Die eingeengten Fraktionen werden mit Wasser verdünnt und das Glykosid jeweils mit Äther ausgeschüttelt. Dadurch wird die Kristallisation beschleunigt und die Reinheit erhöht.

Ausbeuten:	Afzelin	105 mg	Festpunkt 167° C
	Quercitrin	40 mg	Festpunkt 175° C
	Myricitrin	11 mg	Festpunkt 187° C.

Analyse der Reinsubstanzen

a) Bestimmung der Aglykone. Über die Isolierung und Identifizierung der in Hamamelidaceen vorkommenden Aglykone haben wir bereits berichtet (REZNIK u. EGGER 1960). Nach der Hydrolyse der Glykoside wurden die Aglykone durch Vergleich mit authentischen Proben bestimmt. Es liegen vor: Myricetin (My), Quercetin (Q) und Kaempferol (K). Weitere Aglykone wurden nicht beobachtet. Alle Glykoside lassen sich eindeutig auf diese drei Verbindungen zurückführen.

b) Bestimmung der Zuckerkomponenten. Zur qualitativen Bestimmung der Zucker wurden jeweils einige Milligramm des Glykosides hydrolysiert, das Aglykon durch Ausschütteln des Hydrolysates mit Äther von den in der wäßrigen Phase verbleibenden Zuckern getrennt und diese nun chromatographisch durch Vergleich mit Testsubstanzen identifiziert. Es konnten nur Glucose und Rhamnose gefunden werden.

Zur quantitativen Bestimmung des Molverhältnisses Aglykon:Zucker wurden die Glykoside wie zur qualitativen Bestimmung hydrolysiert. Nach der Trennung von Zucker und Aglykon durch Ausschütteln mit Äther wurden beide Phasen auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt (meist 5 ml). 15—20 Startpunkte werden nun mit steigenden Mengen einer Probe beschickt und mit einer gegenläufig steigenden Testreihe zusammen entwickelt. Durch visuellen Vergleich stellt man sodann die übereinstimmenden Flecke von Probe und Testreihe fest und bezieht die Resultate von Zucker- und Aglykon-Bestimmung aufeinander. Daraus ergibt sich das Molverhältnis Aglykon:Zucker. Die erreichbare Genauigkeit beträgt $\pm 15\,\%$. Das reicht zur Entscheidung zwischen ein und zwei Zuckermolekülen aus.

Mit Ausnahme des Spiraeosids sind die Zucker bei allen hier beschriebenen Glykosiden mit dem Aglykon über das Hydroxyl am C_3 verknüpft. Das ergab sich aus dem stets positiven Ausfall des Zirkontestes und der kräftigen UV-Absorption im unbehandelten Zustande.

c) Einzelanalysen. My_2 aus *Parrotia persica* = Myricitrin. Als Aglykon wurde Myricetin erhalten, als Zuckerkomponente ließ sich Rhamnose nachweisen. Als Molverhältnis ergab sich: Myricetin:Rhamnose $= 1:(0{,}9 \pm 0{,}2)$. Die Verbindung ist also ein Myricetin-3-rhamnosid.

Die Elementaranalyse ergab: C 51,61%; H 4,87%. Für Myricitrin mit 1,5 Mol Wasser berechnet: C 51,3%, H 4,69%. Festpunkt 197,5° C, keine Depression des Mischfestpunktes mit authentischem Myricitrin. Das UV-Spektrum zeigt Maxima bei 259,5 und 354 mμ, nach Zusatz von $AlCl_3$ bei 271,5 und 429 mμ, es ist identisch mit dem des Vergleichsmyricitrins, ebenso wie auch die Ultrarotspektren übereinstimmen. Das Spektrum von My_2 zeigt Abb. 3.

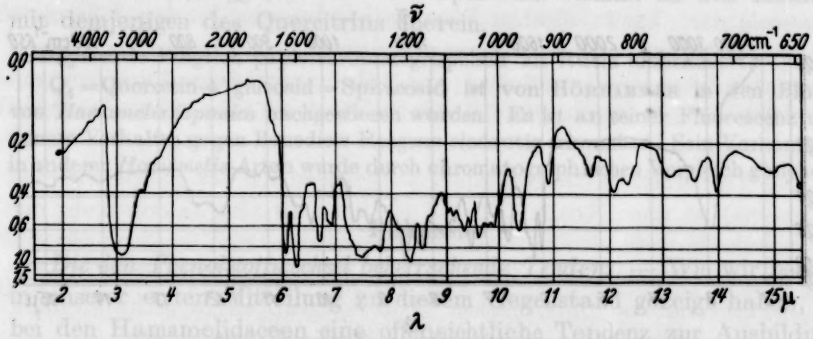


Abb. 3. Ultrarotspektrum des Glykosids My_2 (= Myricitrin)

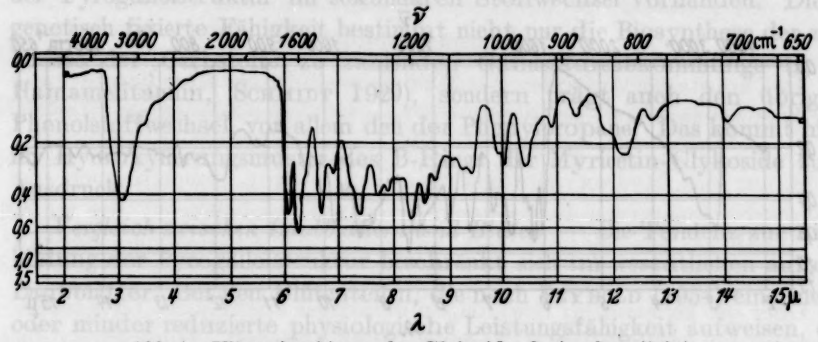


Abb. 4. Ultrarotspektrum des Glykosids Q_2 (= Quercitrin)

Q_2 aus *Corylopsis platypetala* = Quercitrin. Es liefert bei der Hydrolyse Quercetin und Rhamnose im Molverhältnis $1:(0{,}95 \pm 0{,}15)$. Es liegt also Quercetin-3-rhamnosid vor. Elementaranalyse: C 52,84%, H 5,03%. Für Quercitrin + 1,5 Mol Wasser berechnet: C 53,00%, H 4,90%. Festpunkt 175° C, keine Depression mit authentischem Quercitrin. Dieses und Q_2 ergeben identische Ultrarot-Spektren (Abb. 4) und UV-Spektren (Maxima bei 263,5 und 354 mμ, nach Zusatz von $AlCl_3$ bei 274 und 425 mμ).

K_2 = Afzelin aus *Corylopsis pauciflora*. Die Hydrolyse zeigt die Zusammensetzung aus Kaempferol und Rhamnose im Molverhältnis $1:(0{,}95 \pm 0{,}2)$ an. K_2 ist also das als Afzelin bekannte Kaempferol-3-rhamnosid. Die Elementaranalyse ergibt: C 54,9%, H 5,47%. Für

Afzelin + 1,5 Mol Wasser berechnet: C 55,0%, H 5,02%. Festpunkt 167° C, Literaturwert 172° C, Vergleichssubstanz stand nicht zur Verfügung. Das IR-Spektrum zeigt Abb. 5. Das UV-Spektrum zeigt dieselben Maxima wie dasjenige des Astragalins: 267 und 356 mμ, nach Zusatz von $AlCl_3$ 275, 303, 347 und 402 mμ.

K_1 = Astragalin aus *Hamamelis japonica*. Die Hydrolyse ergibt Kaempferol und Glucose im Molverhältnis $1:(0{,}95 \pm 0{,}2)$, es liegt also

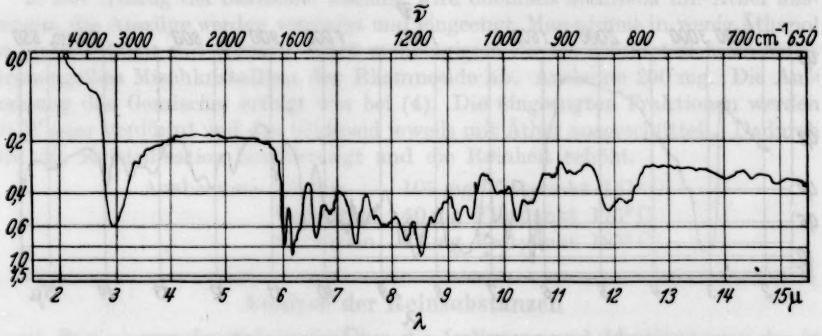


Abb. 5. Ultrarotspektrum des Glykosids K_2 (= Afzelin)

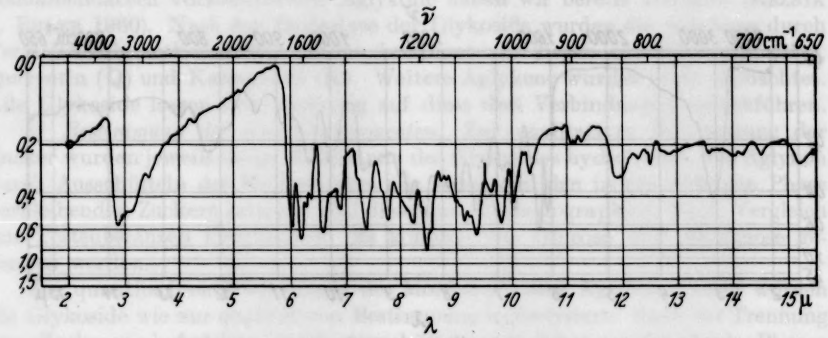


Abb. 6. Ultrarotspektrum des Glykosids K_1 (= Astragalin)

das Kaempferol-3-glucosid vor. Elementaranalyse: C 53,92%, H 4,93%. Für Astragalin + 1 Mol Wasser berechnet: C 54,0%, H 4,73%. Festpunkt 177° C, ergibt mit authentischem Astragalin keine Depression des Festpunkts. Das Ultrarotspektrum ist in Abb. 6 dargestellt und identisch mit dem des Vergleichs-Astragalins. Das UV-Spektrum zeigt Maxima bei: 267 und 356 mμ, nach $AlCl_3$-Zusatz bei 275, 303, 347, 402 mμ.

My_2 und Q_2 aus *Liquidambar*, My_2 und Q_2 aus *Corylopsis pauciflora* und Astragalin aus *Hamamelis virginiana* (Isolierung von 25 mg nach der Vorschrift 5) sind nach UV-Spektrum, R_f-Werten, Mischfestpunkten und Reaktionen mit den betreffenden oben beschriebenen Substanzen identisch.

My_1 = Myricetin-3-glukosid, in Lösung erhalten aus *Corylopsis pauciflora*. Bei der Hydrolyse wird es in Myricetin und Glucose zerlegt. Die Spaltprodukte liegen im Molverhältnis $1:(0{,}9 \pm 0{,}3)$ vor. Das UV-Spektrum zeigt dieselben Maxima wie das Spektrum des Myricitrins.

Q_1 = Isoquercitrin, in Lösung erhalten aus *Corylopsis pauciflora*. Es spaltet sich bei der Hydrolyse in Quercetin und Glucose im Molverhältnis $1:(0{,}95 \pm 0{,}3)$. Das UV-Spektrum stimmt in den Maxima mit demjenigen des Quercitrins überein.

Q_3 wurde lediglich papierchromatographisch als Rutin identifiziert.

Q_4 = Quercetin-4'-glucosid = Spiraeosid ist von HÖRHAMMER in den Blüten von *Hamamelis japonica* nachgewiesen worden. Es ist an seiner Fluorescenz und seinem Verhalten gegen Benedicts Reagens eindeutig erkennbar. Sein Vorkommen in anderen *Hamamelis*-Arten wurde durch chromatographischen Vergleich gesichert.

Diskussion

Die den Phenolstoffwechsel beherrschende Tendenz. — Wie wir bereits in unserer ersten Mitteilung zu diesem Gegenstand gezeigt haben, ist bei den Hamamelidaceen eine offensichtliche Tendenz zur Ausbildung der Pyrogallolstruktur im sekundären Stoffwechsel vorhanden. Diese genetisch fixierte Fähigkeit bestimmt nicht nur die Biosynthese der zur Klasse der Gerbstoffe zu zählenden Gallussäureabkömmlinge (z. B. Hamamelitannin, SCHMIDT 1929), sondern prägt auch den übrigen Phenolstoffwechsel, vor allem den der Phenylpropane. Das kommt hier im Hydroxylierungsmuster des B-Rings der Myricetin-Glykoside zum Ausdruck.

Vergleich zwischen Laubblättern und Blüten. — Die Tendenz zur Ausbildung der Pyrogallolstruktur beschränkt sich im wesentlichen auf die Laubblätter. Bei den Blütenteilen, die nach SEYBOLD (1954) eine mehr oder minder reduzierte physiologische Leistungsfähigkeit aufweisen, erreicht der Hydroxylierungsgrad diese Stufe kaum mehr. Quercetin und Kaempferol treten in den Vordergrund als Indikatoren einer abgeschwächten enzymatischen Aktivität.

Wir können bei den Hamamelidaceen drei physiologische Farbtypen unterscheiden:

1. Bei *Corylopsis* treffen wir deutlich chlorophyllhaltige, wenngleich nur blaß gefärbte Inflorescenzen, die man als „plasmochrom grünes" Stadium (SEYBOLD 1954) ansprechen kann. Es kommt an Vitalität den Laubblättern am nächsten. In der Tat enthalten die *Corylopsis*-Blüten die gleichen Flavonolglykoside wie die Laubblätter, allerdings in geringerer Konzentration, so daß man von einem „verdünnten Laubblatt" sprechen kann.

2. Dem als weiter reduziert aufzufassenden chlorophyllfreien „plasmochrom gelben" Abbaustadium entsprechen die durch Carotinoide gelb

gefärbten Blüten von *Hamamelis*-Arten. Von den Laubblättern sind sie bezüglich der Flavonolführung deutlich abgesetzt: Das Hauptflavonol ist stets das den Blättern fehlende Spiraeosid (Quercetin-3-'glukosid). Die Glykoside der Laubblätter treten nur als Begleitpigmente und zudem in völlig abweichendem Komponentenverhältnis auf.

3. Das Endstadium des physiologischen Abbaus stellen die rein chymochrom pigmentierten weißen männlichen Inflorescenzen bei *Fothergilla monticola* dar. Die in dichten Bündeln zusammenstehenden Filamente der Staubblätter — als Schauapparat wirkend — enthalten vorwiegend Kaempferol-3-glucosid, während die höher oxydierten Verbindungen (Q, My), die die *Fothergilla*-Laubblätter kennzeichnen, kaum nachzuweisen sind.

Das Vorherrschen des Kaempferols (gelegentlich des entsprechenden Apigenins) ist nach ROLLER (1956) geradezu als Charakteristikum der „chymochrom weißen" Blütenblätter anzusehen. Der Verlust an physiologischer Funktion besteht wohl darin, daß Enzyme ausfallen, die für die Einführung von phenolischen Hydroxylgruppen in ortho-Stellung zu bereits vorhandenen verantwortlich sind.

Zur Chemotaxonomie

Das konstante Auftreten des Myricetins stellt ein Familienmerkmal der Hamamelidaceen dar, worauf wir bereits hingewiesen haben (REZNIK u. EGGER 1960). Wir können die Aussage dahingehend erweitern, daß nicht nur das Hydroxylierungsmuster am B-Ring, sondern auch das Glykosidierungsmuster in der gesamten Familie einheitliche Züge trägt, da sämtliche Flavonolglykoside entweder als 3-Glucoside oder als 3-Rhamnoside vorliegen (zwei Ausnahmen s. S. 240).

Über die genetischen Grundlagen derartiger spezifischer Glykosidierungsmuster hat kürzlich HARBORNE (1960) berichtet. Hinsichtlich der Aglyca sei auf das Tricin (3'5'-Dimethoxy-5,7-4'-trihydroxyflavon) verwiesen, das nach BATE-SMITH (1956) für die Laubblätter der Gramineen typisch ist.

Zusammenfassung

1. Aus den Laubblättern von 16 Arten der Hamamelidaceen wurden folgende Flavonolglykoside isoliert:

Myricetin-3-glucosid, Myricetin-3-rhamnosid (Myricitrin), Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin), Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin), Kaempferol-3-glucosid (Astragalin) und Kaempferol-3-rhamnosid (Afzelin).

In den Laubblättern von *Fothergilla monticola* tritt daneben als Ausnahme noch Quercetin-3-rhamnoglucosid (Rutin) auf, in den Blüten der *Hamamelis*-Arten Quercetin-4'-glucosid (Spiraeosid).

2. Die Glykoside sind in ± spezifischen Mustern kombiniert, deren taxonomische und physiologische Bedeutung diskutiert wird.

3. Die Isolierung der Glykoside wird beschrieben und es werden die wichtigsten Analysendaten (Festpunkte, Elementaranalyse, UV-Spektrum, IR-Spektrum) mitgeteilt.

4. Bei der Trennung der Blattglykoside von *Corylopsis* haben sich fraktionierte Bleiacetatfällungen, Ätherausschüttelungen und anschließende Chromatographie auf Cellulosesäulen bewährt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln. Herrn Prof. W. Meyer und Herrn Dr. G. Köbrich (Chemisches Institut Heidelberg) sind wir für die Aufnahme der Infrarotspektren sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

Bate-Smith, E. C.: The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. **27**, 165—176 (1956).

Feenstra, W. J.: Biochemical aspects of seedcoat colour inheritance in *Phaseolus vulgaris* L. Meded. Landbouwhoogeschool Wageningen **60**, (2) 1—53 (1960).

Harborne, J. B.: The genetic variations of anthocyanin pigments in plant tissues. In J. B. Pridham (Editor), Phenolics in plants in health and disease, pp. 109—117. Oxford and London 1960.

Hörhammer, L., u. R. Griesinger: Isolierung von Spiraeosid aus den Blüten von *Hamamelis japonica*. Naturwissenschaften **46**, 427 (1959).

Reznik, H., u. K. Egger: Myricetin — ein charakteristisches Flavonol der *Hamamelidaceae* und *Anacardiaceae*. Z. Naturforsch. B **15**, 247—250 (1960).

Roberts, E. A. H., R. A. Cartwright and D. J. Wood: The flavonols of tea. J. Sci. Food Agric. **7**, 637—646 (1956).

Roller, K.: Über Flavonoide in weißen Blütenblättern. Z. Bot. **44**, 477—500 (1956).

Seybold, A.: Untersuchungen über den Farbwechsel von Blumenblättern, Früchten und Samenschalen. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. **1954**, 31—124.

Schmidt, O. Th.: Die Konstitution des Zuckers am Hamamelitannin. Liebigs Ann. **476**, 250—271 (1921).

Dr. Kurt Egger und Doz. Dr. Hans Reznik,
Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Hofmeisterweg 4

Planta 57, 250—257 (1961)

Aus dem Max Planck-Institut für Meeresbiologie Wilhelmshaven,
Abteilung Hämmerling

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER FORMBILDUNG VON *ACETABULARIA* DURCH SELENAT*

Von
GÜNTHER WERZ

(Eingegangen am 29. Juni 1961)

Die Bedeutung, die Sulfat für den Zellstoffwechsel besitzt (Übersicht bei BERSIN 1950; 1953), führte schon frühzeitig zu Versuchen, das Sulfat durch das analoge Selenat zu ersetzen (z. B. CAMERON 1880). Sulfat und Selenat unterscheiden sich besonders in ihren Oxydationspotentialen, wobei Selenat ein stärkeres Oxydans als Sulfat ist und demgemäß auch leichter reduziert wird (LATIMER 1938). Sonst jedoch sind die beiden Ionenarten in ihrem Verhalten sehr ähnlich, so daß die meisten Organismen nicht in der Lage sind, sie zu unterscheiden. So kann die dadurch bedingte Aufnahme von Selenat an Stelle von Sulfat im S-Stoffwechsel zur Bildung von Selenanalogen führen, die den Verlauf des normalen Zellstoffwechsels abändern können. Dies kann schließlich zu tiefgreifenden Störungen des Wachstums und der Morphogenese führen (RULON 1952; SHRIFT 1954a, b; 1958).

Versuche, Sulfat durch Selenat zu ersetzen, erschienen daher auch bei *Acetabularia* aussichtsreich, deren Zellen bekanntlich ein ausgeprägtes Formbildungsvermögen besitzen (HÄMMERLING 1934). Außerdem besitzen die Acetabularien — neben einer aus sulfathaltigen Polysacchariden bestehenden Oberflächenstruktierung der Zellmembran (WERZ, unveröffentl.) — eine von Art zu Art verschieden ausgeprägte Protoplastenstrukturierung, die aus anionischen — wahrscheinlich ebenfalls sulfathaltigen — Polysacchariden besteht und die als Teil des artspezifischen Wuchsprozesses angesehen werden kann (WERZ 1960b, 1961).

Durch die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen wurde zunächst geprüft, ob Selenat das Längenwachstum (Stielbildung) und die Hutbildung bei *Acetabularia* beeinflußt. Durch die Möglichkeit, Transplantate zwischen verschiedenen Arten herzustellen, wurde weiterhin untersucht, ob durch Selenat auch ein Eingriff in die Ausprägung der Hutform erfolgt, die bekanntlich von artspezifischen „morphogenetischen Substanzen" abhängig ist (BETH 1943; HÄMMERLING 1943, 1946, 1953; MASCHLANKA 1946; WERZ 1955).

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten an den Arten *Acetabularia mediterranea* und *A. crenulata* (im folgenden als *med* und *cren* bezeichnet), die nach den von HÄMMERLING (1944) und BETH (1953) angegebenen Kulturbedingungen (Erd-Schreiberlösung; Licht ~ 2500 lx, 12 Std täglich; 21° C) aufgezogen worden waren[1]. Die Versuchspflanzen waren etwa 30 mm lang und standen kurz vor der Hutbildung. Für die Versuche wurden die Pflanzen in ein künstliches Kulturmedium übertragen, worin sie bis zur weiteren Verwendung 3 Tage blieben. Es hatte folgende ionale Zusammensetzung:

Kationen	mM/1000	Anionen	mM/1000
Na^+	496,9	Cl^-	552,2
K^+	9,0	NO_3^-	2,4
Mg^{++}	55,0	HCO_3^-	2,6
Ca^{++}	8,1	HPO_4^-	0,45
		SO_4^{--}	37,0

Es wird im folgenden als „Sulfatmedium" bezeichnet.

Für die Selenatversuche wurde das Sulfat ganz oder teilweise durch Selenat ersetzt. Da in einem Medium, in dem Sulfat äquimolar durch Selenat ersetzt war, kernhaltige und kernlose Zellen bei 24stündiger Behandlung im Licht irreversibel kontrahierten und anschließend starben, wurde ein Sulfat-Selenat-Mischmedium verwendet, das sich hinsichtlich der Überlebensrate der kernhaltigen Zellen sowie der Verzögerung der Regeneration als brauchbar erwies. Seine molaren Anteile waren 0,011 M SO_4^{--} (30%) zu 0,026 M SeO_4^{--} (70%). Es ist im folgenden als „Selenatmedium" bezeichnet.

Kernlose Zellen wurden durch einfache Amputation der kernhaltigen Rhizoide erhalten. Die Herstellung der einkernigen Transplantate erfolgte nach den von HÄMMERLING (1943) und BETH (1943) angewendeten Methoden. Es wurden stets ganze kernlose Zellen auf ein kernhaltiges Rhizoid mit bis zu 5 mm Stiel transplantiert. Eine Transplantation wurde als positiv bezeichnet, wenn die Transplantatpartner verwachsen waren, nicht kontrahierten und unter Stiel- und Wirtelbildung Regeneration des auftransplantierten kernlosen Teilstückes bis zur Bildung definierbarer Hüte erfolgte (HÄMMERLING 1943; WERZ 1955). Für die Auswertung wurde nur die Form des ersten bei einem Transplantat gebildeten Hutes verwendet. Es wurden artgleiche und artverschiedene Transplantate untersucht.

Ergebnisse

Im künstlichen „Sulfatmedium" wuchsen alle kernhaltigen Zellen von *med* und von *cren* bei Belichtung weiter und bildeten typische Hüte. Auch die kernlosen Zellen der beiden Arten zeigten keine Wuchsstörungen und bildeten bei *med* zu 95%, bei *cren* zu 80% typische Hüte. Übertragung in die normalerweise verwendete Erd-Schreiberlösung veränderte die Überlebensrate und die Hutbildung nicht.

[1] Herrn stud. rer. nat. KLAUS KLOPPSTECH, Kiel, danke ich für wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Bei Anwendung des „Selenatmediums" dagegen erfolgte bei kernhaltigen Zellen ein sofortiger Stop des Längenwachstums. Nach 24stündiger Behandlung und anschließender Übertragung in Erd-Schreiberlösung blieben nach den folgenden 24 Std bei *med* 40%, bei *cren* 85% am Leben. Teilweise bildeten diese übriggebliebenen Zellen nach verschieden langer Verzögerung typische Hüte. Zum Teil wuchsen die Zellen ohne Hutbildung weiter, wobei — besonders bei *cren* deutlich zu sehen — die Stielspitzen völlig aufgehellt erschienen. Dies führte meist zu Kontraktionen der Protoplasten, wonach jedoch vom kernhaltigen Rhizoid ausgehend wieder neue Regeneration erfolgen konnte, bis schließlich normale Wuchsraten auftraten und typische Hüte gebildet wurden. Die *überlebenden* kernhaltigen Zellen erwiesen sich also nur reversibel geschädigt.

Bei kernlosen Zellen, die einen Tag vor der Übertragung in das Selenatmedium hergestellt worden waren, wurde das Wachstum ebenfalls sofort eingestellt. Sie blieben nach Übertragung in Erd-Schreiberlösung zu etwa 30% bei *med*, zu etwa 50% bei *cren* ohne zum Absterben führende Kontraktionen. Diese überlebenden Zellen wuchsen jedoch nicht weiter, waren also irreversibel geschädigt. Die Schädigung beruht auf der Aufnahme des Selenates. Denn kernhaltige und kernlose Zellen, die in Sulfatmangelmedien ohne Selenatzusatz gehalten wurden, wiesen zwar ebenfalls eine Wuchshemmung auf, die aber nach Rückversetzung in Erd-Schreiberlösung auch bei den kernlosen Zellen nur reversibel war. Toxische Wirkungen des Selenates traten im übrigen nur bei Belichtung der Zellen auf. Wurde es über 24 Std bei Dunkelheit appliziert, so erfolgten nach Rückversetzung in Erd-Schreiberlösung weder Kontraktionen noch Störungen der Formbildung.

Wurden selenatbehandelte kernhaltige Zellen erst nach der Übertragung in Erd-Schreiberlösung zerschnitten, so daß kernlose ganze Zellen und kernhaltige Rhizoide entstanden, so regenerierten die kernhaltigen Rhizoide nach einer verschieden langen Verzögerung zu 60%. Die Überlebenden bildeten typische Hüte. Die kernlosen Zellen dagegen waren 24 Std nach der Amputation zu 95% irreversibel kontrahiert. Solche kernlosen Zellen, bei denen sich die Selenatvergiftung also besonders stark äußerte, wurden sofort nach der Amputation auf kernhaltige Rhizoide der gleichen oder der anderen Art transplantiert. Hierdurch verringerte sich die Absterberate auf 40%.

Bei Transplantation einer kernlosen selenatbehandelten Zelle auf ein nicht behandeltes kernhaltiges Rhizoid der gleichen Art ($cren_0^*$ $cren_1$; med_0^* med_1) entstanden stets kerngemäße Hüte. Ihre Bildung war gegenüber nicht behandelten Kontrollplantaten verzögert. Gegenüber den *in toto* selenatbehandelten Zellen ($cren_0^*$; med_0^*) dagegen setzte die Hutbildung wesentlich früher ein.

Wurden artverschiedene Transplantate zwischen unbehandelten kernlosen *cren*-Zellen und nicht behandelten *med*-Rhizoiden hergestellt, so wurden auf Grund der im *cren*-Teil gespeicherten artspezifischen *cren*-Substanzen der Regel entsprechend (vgl. HÄMMERLING 1943; WERZ 1955) zu 92% typische Zwischenhüte gebildet (Zh; Tabelle 1). Transplantate zwischen nicht behandelten kernlosen *cren*-Zellen und selenatbehandelten *med*-Rhizoiden bildeten zu 84% ebenfalls typische Zwischenhüte. Daneben traten 16% Zwischenhüte mit deutlicher Ablenkung gegen *cren* auf (Zh → *cren*; Tabelle 1). Wurden aber Transplantate zwischen einer selenatbehandelten kernlosen *cren*-Zelle und einem nicht behandelten *med*-Rhizoid geprüft, so ergab sich, daß die entstandenen Hüte zu 24% kerngemäß (*med*), zu 73% stark gegen *med* abgelenkt waren (Zh → *med*; Tabelle 1) und lediglich zu 3% als typische Zwischenhüte ausgeprägt wurden. Für Abbildungen dieser verschiedenen Zwischenstufen siehe WERZ 1955.)

Tabelle 1. *Verteilung der Form der ersten entstandenen Hüte von einkernigen artverschiedenen Transplantaten, deren beide Partner unbehandelt waren oder von denen je ein Transplantatpartner mit Selenat behandelt war.*

	Form des ersten entstandenen Hutes					N
	cren	Zh → *cren*	Zh	Zh → *med*	*med*	
$cren_0\ med_1$ . . .	0%	6%	92%	2%	0%	50
$cren_0\ med_1^*$ . .	0%	16%	84%	0%	0%	31
$cren_0^*\ med_1$ . .	0%	0%	2%	73%	24%	79

* = behandelter Partner; N = Anzahl geprüfter positiver Transplantate.

Auch hierbei fiel es auf, daß die Hutbildung bei den Kontrolltransplantaten am frühesten einsetzte. Mit nur kurzfristiger Verzögerung bildeten die Transplantate mit behandelten *med*-Rhizoiden Hüte, während bei den Transplantaten mit behandeltem kernlosen *cren*-Partner am spätesten Hüte gebildet wurden.

Besprechung der Befunde

Die mitgeteilten Untersuchungen an kernhaltigen und kernlosen Zellen von *Acetabularia mediterranea* und *A. crenulata* ergaben, daß bei Behandlung mit Selenat eine sofortige Sistierung der Stiel- und der Hutbildung erfolgte. Zunächst seien die Wirkungen auf kernlose Zellen besprochen. Der Einfluß von Selenat führte bei diesen ($cren_0^*$; med_0^*) zu irreversibler Aufhebung der Morphogenese. Wie die Befunde an den artverschiedenen $cren_0^*\ med_1$-Transplantaten zeigten, wurden während der Selenatbehandlung bei den kernlosen Zellen auch die artspezifischen Formbildungsprozesse irreversibel blockiert, was zur Bildung weitgehend

oder ganz kerngemäßer Hüte führte. Wäre die Blockierung reversibel gewesen oder nur an nicht artspezifischen Komponenten erfolgt, so wären zu einem weitaus größeren Teil typische Zwischenhüte gebildet worden. Wir können daher folgern, daß Selenat eine weitgehende Zerstörung oder irreversible Veränderung der in den kernlosen Zellen normalerweise gespeicherten artspezifischen „morphogenetischen Substanzen" verursachte.

Dieser Schluß gründet sich auf die Befunde an unbehandelten artverschiedenen, ein- bis vierkernigen Transplantaten. Bei diesen hängt der Grad einer entstehenden Zwischenstufe vom Mengenverhältnis der kernabhängigen artspezifischen „morphogenetischen Substanzen" ab. In den einkernigen Transplantaten wird er bestimmt vom Mengenverhältnis der im kernlosen Partner gespeicherten und den vom artverschiedenen Kern neu produzierten Substanzen (HÄMMERLING 1943, 1946, 1953; WERZ 1955). In unserem Falle werden, wie die Ergebnisse zeigen, vom Kern des unbehandelten *med*-Partners *med*-Stoffe neu produziert, im mit Selenat behandelten *cren*-Partner war aber die Menge der gespeicherten *cren*-Substanzen herabgesetzt worden. Dadurch wurde das Mengenverhältnis von *cren*- zu *med*-Substanzen zugunsten der *med*-Stoffe verschoben, so daß die Ausprägung der Hutform mehr oder weniger *med*-mäßig erfolgte.

Die artspezifischen „morphogenetischen Substanzen" können sich nur auswirken, wenn im System außerdem nicht artspezifische, ebenfalls kernabhängige Komponenten in ausreichender Menge vorhanden sind (BETH 1943; HÄMMERLING 1943, 1953). Ob diese ebenfalls zu den „morphogenetischen Substanzen" im engeren Sinne zu zählen sind, ist unsicher (HÄMMERLING 1953; Anm. S. 488). Werden $cren_0$ med_1-Transplantate unter Verwendung von $cren_0$-Hinterstücken hergestellt, die so gut wie keine „nicht artspezifischen Substanzen" enthalten, so läßt sich zeigen, daß diese vom *med*-Kern neu produziert werden (HÄMMERLING 1943). Sicher ist das auch der Fall, wenn der kernlose Partner selenatbehandelt war. Nun verwendeten wir aber als solche ganze kernlose *cren*-Zellen. Diese enthielten vor der Selenatbehandlung erhebliche Mengen „nicht artspezifischer Substanzen". Ob diese ebenso wie die „artspezifischen Substanzen" durch die Selenatbehandlung zerstört wurden, läßt sich nicht sicher sagen. Dafür spricht, daß die selenatbehandelten kernlosen Zellen überhaupt keine Morphogenese (auch keine Stielbildung) aufwiesen, obwohl sie noch bestimmte Mengen „artspezifischer Substanzen" enthielten[1]. Man sollte danach erwarten, daß sie wenigstens ein geringes Formbildungsvermögen behalten hätten, wenn „nicht artspezifische Substanzen" in ausreichender Menge erhalten geblieben wären.

Beschränken wir uns auf die artspezifischen „morphogenetischen Substanzen", so werden bei den $cren_0^*$ med_1-Transplantaten die vom *med*-Kern neu produzierten *med*-Substanzen durch den selenatbehandelten

[1] Es ist nicht richtig, nur die Hutbildung als Morphogenese zu bezeichnen. Auch die Bildung neuen Stieles (sowie von Wirteln) ist ein morphogenetischer Prozeß (vgl. hierzu ERRERA und VANDERHAEGHE 1957).

cren-Partner hindurch transportiert, ebenso die nicht zerstörten *cren*-Substanzen (über die Anreicherung artspezifischer Substanzen am Stielende siehe WERZ 1955). Ihre Auswirkung wird aber nicht blockiert, nur zeitlich verzögert. Offenbar wird also einmal aufgenommenes Selenat ziemlich bald ausgeschieden oder in eine Form überführt, welche nicht mehr die Induktion der artspezifischen morphogenetischen Prozesse verhindert.

War auch der Kern mit Selenat behandelt worden, so wurde die Hutbildung nicht unterdrückt, wohl aber zeitlich verzögert; am stärksten in den ganzen behandelten Zellen, in denen ja auch das gesamte Cytoplasma der Selenatwirkung ausgesetzt war, geringer bei den artgleichen Transplantaten ($cren_0\ cren_1^*$ und $med_0\ med_1^*$), bei denen vom Cytoplasma nur der kleine kernhaltige Partner behandelt war. Im Gegensatz zum Cytoplasma sind also irreversible Kernschädigungen nicht festzustellen. Die Neuproduktion „morphogenetischer Substanzen" geht weiter, doch deuten die Befunde an den ganzen Zellen — allmähliche Erreichung der normalen Wuchsrate — darauf hin, daß ihre Produktionsrate vorübergehend gesenkt wird. In diese Auffassung fügen sich auch die Befunde an artverschiedenen Transplantaten mit behandeltem kernhaltigen Partner ein ($cren_0\ med_1^*$), bei denen — außer der Verzögerung der Hutbildung — auch die Hutform etwas stärker nach *cren* verschoben erschien als bei den unbehandelten Kontrollen.

Auffallend sind die Parallelen zu einer U.V.-Bestrahlung auf Kern und Cytoplasma. Sowohl durch Selenat als auch durch U.V.-Bestrahlung wird die Morphogenese in kernlosen Zellen irreversibel geschädigt, nicht aber in kernhaltigen Zellen (HÄMMERLING 1956; SIX 1956, 1958; ERRERA und VANDERHAEGHE 1957). In beiden Fällen — U.V.-Bestrahlung und Selenatbehandlung — läßt sich diese Endwirkung darauf zurückführen, daß zumindest die im Cytoplasma gespeicherten artspezifischen „morphogenetischen Substanzen" zerstört werden, während ihre Neuproduktion bei Gegenwart des Zellkernes weitergeht, wobei sie sich auch in vorbehandelten kernlosen Zellbezirken auswirken (für U.V. siehe WERZ und HÄMMERLING 1961). Es ist Gegenstand weiterer Untersuchungen, zunächst auf cytochemischem Wege zu ermitteln, welche weiteren Wirkungen sich nach Selenatbehandlung und U.V.-Bestrahlung feststellen lassen und welche Übereinstimmungen oder Unterschiede sich dabei ergeben, z.B. hinsichtlich der an der Stielspitze vorkommenden Anreicherungen von speziellen Proteinen (WERZ 1959), Ribosenukleinsäure (WERZ 1960a) und artspezifischen Protoplastenstrukturierungen, die aus anionischen — wahrscheinlich sulfathaltigen — Polysacchariden aufgebaut sind (WERZ 1960b, 1961). Vielleicht wird auf diesem Wege ein Einblick in einzelne Schritte möglich, durch welche eine Übertragung genetischer Informationen vom Kern zum Cytoplasma erfolgt. Die

vorstehenden Untersuchungen bestätigen jedenfalls das Vorkommen von Substanzen, welche unter der Wirkung der genetischen Anteile des Kernes entstehen und im Cytoplasma artspezifische Formbildung induzieren.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen über Wirkungen von Selenat, das an Stelle von Sulfat bei belichteten kernhaltigen und kernlosen Zellen von *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia crenulata* appliziert wurde, ergaben:

1. Selenat blockiert das Längenwachstum und die Hutbildung. Nach Übertragung der behandelten Zellen in Normalmedium wurde bei kernhaltigen Zellen die Blockierung wieder aufgehoben, bei kernlosen Zellen dagegen war die Schädigung irreversibel.

2. Bei artverschiedenen einkernigen Transplantaten, deren kernloser Partner selenatbehandelt war ($cren_0^*$ med_1), wurde die Hutform gegenüber den unbehandelten Kontrollen ($cren_0$ med_1) stark nach *med* verschoben. Bei Transplantaten mit selenatbehandeltem Kern wurde sie leicht nach *cren* verschoben ($cren_0$ med_1^*).

3. Die Befunde führen zu der Deutung, daß durch Selenat im Cytoplasma gespeicherte „morphogenetische Substanzen" zerstört werden, sicher die artspezifischen, vielleicht auch die „nicht artspezifischen Substanzen". Wird dagegen ein kernhaltiges System mit Selenat behandelt, so läuft die kernabhängige Neuproduktion „morphogenetischer Substanzen" weiter, und zwar sowohl der art- wie der nicht artspezifischen Substanzen, jedoch wahrscheinlich in vorübergehend verminderter Stärke.

Literatur

BERSIN, TH.: Die Phytochemie des Schwefels. Advanc. Enzymol. **10**, 223 (1950).

— Schwefel. In SCHWIEGK, Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.

BETH, K.: Ein- und zweikernige Transplantate zwischen *Acetabularia mediterranea* und *Acicularia Schenckii*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **81**, 271 (1943).

— Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen *Acetabularia*-Zellen. Z. Naturforsch. 8b, 334 (1953).

CAMERON, C. A.: Preliminary note on the absorption of selenium by plants. Roy. Dublin Soc., Sci. Proc. **2**, 231 (1880).

ERRERA, M., et F. VANDERHAEGHE: Effets des rayons uv. sur *Acetabularia mediterranea*. Exp. Cell Res. **13**, 1 (1957).

HÄMMERLING, J.: Über formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **131**, 1 (1934).

— Ein- und zweikernige Transplantate zwischen *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia crenulata*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **81**, 114 (1943).

HÄMMERLING, J.: Zur Lebenweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen. Arch. Protistenk. **97**, 7 (1944).
— Dreikernige Transplantate zwischen *Acetabularia crenulata* und *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. **1**, 337 (1946).
— Nucleo-cytoplasmic relationship in the development of *Acetabularia*. Int. Rev. Cytol. **2**, 475 (1953).
— Wirkungen von U.V.- und Röntgenstrahlen auf kernlose und kernhaltige Teile von *Acetabularia*. Z. Naturforsch. **11b**, 217 (1956).
LATIMER, W. M.: The oxydation states of the elements and their potentials in aqueous solutions 1938. Aus A. SHRIFT, Bot. Rev. **24**, 550 (1958).
MASCHLANKA, H.: Kernwirkungen in artgleichen und artverschiedenen *Acetabularia*-Transplantaten. Biol. Zbl. **65**, 167 (1946).
RULON, O.: The modification of developmental patterns in the sand dollar by sodium selenite. Physiol. Zool. **25**, 333 (1952).
SHRIFT, A.: Sulfur-selenium antagonism. I. Antimetabolite action of selenate on the growth of *Chlorella vulgaris*. Amer. J. Bot. **41**, 223 (1954a).
— Sulfur-selenium antagonism. II. Antimetabolite action of selenomethionin on the growth of *Chlorella vulgaris*. Amer. J. Bot. **41**, 345 (1954b).
— Biological activities of selenium compounds. Bot. Rev. **24**, 550 (1958).
SIX, E.: Die Wirkung von Strahlen auf *Acetabularia*. I. Wirkung von ultravioletten Strahlen auf kernlose Teile von *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. **11b**, 463 (1956).
— Die Wirkung von Strahlen auf *Acetabularia*. III. Die Wirkung von Röntgenstrahlen und ultravioletten Strahlen auf kernhaltige Teile von *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. **13b**, 6 (1958).
WERZ, G.: Kernphysiologische Untersuchungen an *Acetabularia*. Planta (Berl.) **46**, 113 (1955).
— Über polare Plasmaunterschiede bei *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 502 (1959).
— Anreicherung von Ribonukleinsäure in der Wuchszone von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **55**, 22 (1960a).
— Über Strukturierungen der Wuchszonen von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **55**, 38 (1960b).
— Unterschiede der Protoplastenstrukturierungen bei verschiedenen Dasycladaceen und ihre Abhängigkeit von artspezifischen Kernwirkungen. Planta (Berl.) **56**, 490 (1961).
—, u. J. HÄMMERLING: Über die Beeinflussung artspezifischer Formbildungsprozesse von *Acetabularia* durch U.V.-Bestrahlung. Z. Naturforsch. (1961, im Druck).

Dr. G. WERZ,
Max Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling,
Wilhelmshaven, Anton Dohrn-Weg

Planta 57, 258—265 (1961)

Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik in Hamburg

ÜBER DIE AKTIVIERUNG DES HEMMSTOFFSYSTEMS VON *HELIANTHUS* DURCH KURZFRISTIGE BELICHTUNG*

Von

MARGRET BAYER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 30. Juni 1961)

Einleitung

Über Lichtwirkungen auf das Wachstum der Pflanzen liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Neuere Arbeiten von MELCHIOR (1957), BLAAUW-JANSEN (1959), MEIJER (1959) und RUGE (1960) kamen teils zu dem Ergebnis, daß Wuchsstoff durch Licht in den Pflanzen zerstört werde, teils auch, daß unter dem Einfluß von Licht Wuchsstoffe gebildet werden können. Daß *Hemmstoffe* unter Lichteinfluß entstehen oder aktiviert werden können, ist meines Wissens bisher nur von VIEHMANN (1938) und MEYER (1958) angegeben worden. VIEHMANN erhielt, wenn er mittels Agarmethode aus im Dunkeln gezogenen *Helianthus*-Keimlingen Wuchsstoff abzufangen suchte, im Hafertest ganz geringe positive Krümmungen, wenn der Wuchsstoff *auch im Dunkeln* abgefangen wurde; dagegen traten sehr ausgeprägte positive Krümmungen auf, wenn das Abfangen *im Licht* geschah, woraus auf die Bildung von Hemmstoff im Licht zu schließen ist. Dieses Ergebnis wurde von VIEHMANN mehr beiläufig im Zuge anderer Untersuchungen erhalten. MEYER (1958) beobachtete an Haferkoleoptilen, daß aus zugesetzter Indolylessigsäure bei Belichtung mit 10000 Lux in 1—2 Std ein wachstumshemmendes Abbauprodukt, Indolaldehyd, gebildet wurde, der dann fermentativ in die ebenfalls hemmende Indolkarbonsäure umgewandelt wurde. Die Hemmwirkung beider Stoffe beruht nach MEYER auf der Blockierung des normalen Wuchsstofftransportes.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den Befund von VIEHMANN, die Hemmstoffbildung bei *Helianthus* durch 2—3stündige Belichtung mit etwa 600 Lux ohne weiteren Wuchsstoffzusatz, zu bestätigen.

Material und Methodik

1 cm lange Hypokotylstückchen von *Helianthus annuus*, Sorte „*Bismarckianus*", wurden aus meist 4—10 Tage alten Keimlingen, die im Dunkeln kultiviert worden waren, bei Rotlicht an Spitze und Basis herausgeschnitten. Die Stücke wurden in

* Teil einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg.

normaler Stellung mitten auf je 4 nebeneinander liegende Agarwürfel gesetzt und das Ganze in mit feuchtem Fließpapier ausgelegte Petrischalen gebracht. Ein Teil dieser Präparate wurde im Dunkeln belassen, der andere Teil wurde auf der waagerechten rotierenden Scheibe eines Klinostaten einer allseitig wirkenden Beleuchtungsstärke von ungefähr 600 Lux ausgesetzt (2 gegenüberstehende 200-Watt-Lampen in 0,82 m Entfernung vom Präparat). Um eine bessere seitliche Belichtung der Hypokotylzylinder zu erreichen, wurde der Deckel der Petrischalen durch eine ebene Glasplatte ersetzt. Zwischen Lichtquelle und den Versuchsstengeln wurde ein die Wärmestrahlen absorbierendes Filter zwischengeschaltet (3%ige $CuSO_4$-Lösung in 5 cm Schichtdicke). Nach einer Abfangdauer von 2—4 Std wurden die Hypokotylzylinder entfernt und die Agarpräparate im Haferkrümmungstest (Tageslichttest nach SÖDING 1952) auf ihren Wirkstoffgehalt geprüft.

Da aus diesen Versuchen die Existenz von Hemmstoff nicht sicher zu erkennen war, wurden, wie bei der vorhergehenden Arbeit (vgl. BAYER 1961), Kompensationsteste ausgeführt, in denen den *Helianthus*-Präparaten vor dem Wuchstofftest unter- oder überoptimale Mengen von synthetischer Indolylessigsäure (IES) zugesetzt wurden. Als Kontrollen dienten dabei reine IES-Lösungen der entsprechenden Konzentration. Hierbei riefen nun die Präparate mit *Helianthus*-Wirkstoff und IES, wenn die Pflanzen belichtet worden waren, geringere Krümmungen hervor als die reinen IES-Präparate, woraus auf Hemmstoff in belichteten *Helianthus*-Hypokotylen geschlossen werden konnte.

Versuchsergebnisse

1. Versuche ohne IES-Vorlage. In den Dunkelversuchen mit verschieden alten Keimlingen wurden schwankende Krümmungen (Durchschnittswerte bis zu maximal 2,5° im Versuch) erreicht, in den Belichtungsversuchen ergaben sich Werte zwischen 0 und 1,8° (Versuche mit jeweils je 100 Agarwürfeln im Licht und im Dunkeln). Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Serien ist also nicht feststellbar, wenn auch das Ergebnis in den Lichtversuchen einen Hemmstoff vermuten läßt, der sich gelegentlich in geringen positiven Krümmungen bemerkbar machte. Die deutlichen positiven Krümmungen, die von VIEHMANN mit derselben Methodik ermittelt worden waren (bis zu + 13°), konnten von mir jedenfalls nicht bestätigt werden.

2. Kompensationsteste. Da die Existenz von Hemmstoff aus den beschriebenen Versuchen nicht sicher hervorgeht, wurden Kompensationsteste mit unter- und überoptimalen Vorlagen von synthetischer IES vor dem Krümmungstest ausgeführt. Die IES-Konzentrationen in den Agarwürfeln schwankten in den Versuchen mit unteroptimalen IES-Vorlagen zwischen $8:10^8$, $1:10^7$ und $2:10^7$, je nach den für die jahreszeitliche Empfindlichkeit der Testkoleoptilen erforderlichen Verhältnissen. Bei den Versuchen mit überoptimaler IES-Vorlage betrugen die Konzentrationen in den Agarwürfeln $1:10^6$, $2:10^6$, $3:10^6$ und $1:10^5$. Die meistverwendeten Konzentrationen waren $2:10^6$ und $3:10^6$. Als Kontrollen dienten reine IES-Lösungen der entsprechenden Konzentrationen.

a) Versuche mit unteroptimaler IES-Zugabe. Zur Ausführung der Teste erwies es sich als notwendig, für jeden Versuchstag die IES-Empfindlichkeit der Testpflanzen zu prüfen. Während der Frühjahrs- und Sommermonate waren Konzentrationen von $8:10^8$ bis $1:10^7$, während der Herbstmonate solche von $1:10^7$ und $2:10^7$ für die Versuche mit unteroptimalen IES-Vorlagen am besten geeignet. Nach einer Abfangdauer von 2—3 Std wurden die Hypokotylzylinder von den Agarwürfeln entfernt und diesen 1—2 Std vor Ausführung des Krümmungstestes die entsprechende IES-Lösung zugesetzt. Getestet wurden 6, 8, 9, 10 und 18 Tage alte Keimlinge.

Tabelle

Alter der Keimlinge in Tagen	IES-Konzentrationen	IES-Kontrollen	IES-Lösung + abgefangener Wirkstoff	
			oben	unten
	Dunkelversuche			
6	$2:10^7$	45,0°	49,5°	45,6°
8	$1:17^7$	28,6°	34,1°	33,5°
9	$2:10^7$	29,7°	32,7°	29,2°
10	$3:10^7$	20,0°	24,7°	21,0°
18	$8:10^8$	16,0°	16,8°	15,5°
	Belichtungsversuche			
6	$2:10^7$	45,0°	44.9°	43,1°
8	$1:10^7$	28,6°	29,7°	26,0°
9	$2:10^7$	29,7°	32,0°	29,2°
10	$3:10^7$	20,0°	19,2°	16,4°
18	$8:10^8$	16,0°	14,6°	14,4°

Alle Krümmungswerte sind Mittel aus etwa je 40—60 getesteten Agarwürfeln.

Die Differenz zwischen reiner IES-Lösung und IES-Lösung + *Helianthus*-Wirkstoff beträgt demnach[1] bei

	Dunkel	Licht
6 Tage alten Keimlingen		
oberer Stengelabschnitt . .	+4,5°	−0,1°
unterer Stengelabschnitt .	+0,6°	−1,9°
8 Tage alten Keimlingen		
oberer Stengelabschnitt . .	+5,5°	+1,1°
unterer Stengelabschnitt .	+4,9°	−2,6°
9 Tage alten Keimlingen		
oberer Stengelabschnitt . .	+3,0°	+2,3°
unterer Stengelabschnitt .	−0,5°	−0,5°
10 Tage alten Keimlingen		
oberer Stengelabschnitt . .	+4,7°	−0,8°
unterer Stengelabschnitt .	+1,0°	−3,6°
18 Tage alten Keimlingen		
oberer Stengelabschnitt . .	+0,8°	−1,4°
unterer Stengelabschnitt .	−0,5°	−1,6°

[1] Durch diese Rechenmethode müssen die üblichen Vorzeichen für positive Krümmungen (+) und negative Krümmungen (—) vertauscht werden. In diesem Fall kennzeichnet also — einen Hemmstoff, + einen Wuchsstoff.

Die Ergebnisse der Kompensationsteste mit unteroptimaler IES-Vorlage vor dem Avenatest zeigt die Tabelle.

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß in den Dunkelversuchen ein Wuchsstoff in Agar abgefangen werden konnte, der die in den Kontrollversuchen (reine IES-Lösungen) erzielten Krümmungen verstärkt. Er tritt vor allem in oberen Stengelteilen auf.

In den Lichtversuchen hingegen macht sich, vorwiegend in unteren Stengelteilen, durch verringerte Wuchsstoff-Krümmungen ein Hemmstoff bemerkbar.

b) Versuche mit überoptimaler IES-Zugabe. Den Agar-Abfang-Präparaten wurden IES-Konzentrationen zwischen $1:10^6$ und $1:10^5$ zugesetzt. In Vergleichsuntersuchungen zeigten die Testkoleoptilen bei Konzentrationen zwischen $5:10^7$ und $1:10^6$ maximale Krümmungswerte.

Getestet wurden Hypokotylzylinder 4—12 Tage alter Keimlinge.

Die Krümmungswerte der IES-Kontrollpräparate lagen in den einzelnen Versuchen verschieden hoch und schwankten nach der Empfindlichkeit des Testes und den zugegebenen IES-Konzentrationen zwischen 23,5 und 41,7°.

Die graphische Darstellung (Abb. 1) zeigt die Mittelwerte der Krümmungsabweichungen zwischen getesteter IES-Lösung + abgefangenem Wirkstoff und reiner IES-Lösung.

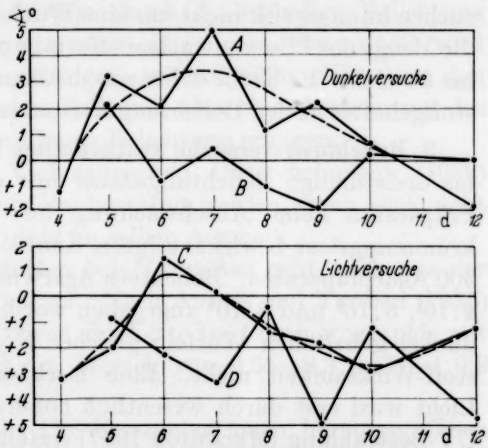


Abb. 1. Mittelwerte der Krümmungsdifferenzen zwischen getesteter IES-Lösung und abgefangenem Wirkstoff und reiner IES-Lösung bei überoptimaler IES-Vorlage. Abszisse: Alter der Keimlinge in Tagen. Ordinate: Differenz zwischen dem Effekt von IES-Lösung + abgefangenem Wirkstoff und reiner IES-Lösung. Kurven *A* und *C*: Aus oberen Stengelteilen abgefangene Wirkstoffmenge. Gestrichelt: idealisierte Kurven *A* und *C*. Kurven *B* und *D*: Aus unteren Stengelteilen abgefangene Wirkstoffmenge. Jeder Kurvenpunkt ist ein Mittel aus 50—100 getesteten Präparaten (nur der Wert 4 Tage alter Keimlinge bezieht sich jeweils auf 20 Präparate)

Wie Kurve A veranschaulicht, wird in den *Dunkel*versuchen durch abgefangenes Auxin der Hypokotyl*spitzen* die IES-Wirksamkeit erhöht (Ausnahmen bei 4 und 12 Tage alten Keimlingen). Der Gehalt an abfangbarem Wuchsstoff ist bei 5—10 Tage alten Keimlingen offensichtlich größer als bei 4 und 12 Tage alten. Der aktive, abfangbare Wuchsstoff wird vermutlich erst durch Umwandlung eines in inaktiver Form in den Samen vorliegenden Wuchsstoffes mobilisiert und tritt daher erst bei etwas älteren Keimlingen in Erscheinung. Bei Pflanzen, die 12 Tage im Dunkeln aufgezogen wurden, ist die Wuchsstoffleitung inzwischen vermutlich so gestört, daß sie keinen Wuchsstoff mehr abgeben können. Aus Kurve B ist zu entnehmen, daß Agar-Abfang-Präparate mit Wirkstoffen aus den Hypokotyl*basen* und synthetischer IES keine nennenswerten Abweichungen gegenüber den IES-Kontrollen hervorrufen.

In den *Licht*versuchen zeigen nur obere Hypokotylzylinder 6 Tage alter Keimlinge einen schwachen Wuchsstoffgehalt (Kurve C).

Alle übrigen und die der unteren Stengelstücke (Kurve D) setzen die IES-Wirksamkeit herab oder sind wirkungslos. Die starken Schwankungen

innerhalb Kurve D lassen darauf schließen, daß sich hier irgendwelche gegenläufigen Vorgänge abspielen. Als solche sind zu vermuten: zunehmende Wuchsstoffbildung in den verdunkelten Keimlingen (von GUTTENBERG und ZETSCHE 1956), zunehmend erschwerte oder gar nicht mehr stattfindende Wuchsstoffleitung und schließlich, da die Krümmungen meist positiv gerichtet sind, Hemmstoffbildung.

Bei der Hemmung gegenüber der IES-Kontrolle in den Lichtversuchen kann es sich nicht um eine Wuchsstoff-Zerstörung handeln, denn die Menge des Pflanzenwuchsstoffes fällt gegenüber der IES-Vorlage nicht ins Gewicht. Es bleibt daher nur die Annahme eines vermehrten Hemmstoffgehaltes in den Belichtungsversuchen.

3. Belichtungsversuche synthetischer IES-Präparate. Daß eine zwei- bis dreistündige Belichtungsdauer mit etwa 600 Lux bei reinen IES-Präparaten keine Abschwächung der Wuchsstoffwirkung im Haferkrümmungstest bewirkt, zeigten Kontrolluntersuchungen an insgesamt 900 Agarpräparaten. Belichtete Agarwürfel, denen eine IES-Menge von $4:10^8$, $5:10^8$ und $8:10^8$ zugegeben worden war, unterschieden sich von dunkel gehaltenen Würfeln gleicher Konzentrationen in ihrer Wuchsstoff-Wirksamkeit nicht. Eine merkbare IES-Zerstörung durch das Licht wird erst durch wesentlich höhere Lichtintensitäten oder durch UV-Bestrahlung (MELCHIOR 1957) erzielt.

Diskussion

Durch die Agar-Abfangversuche läßt sich aus dunkel gehaltenen Keimlingen mit Hilfe des Kompensationstestes ein Wuchsstoff gewinnen, der die durch unter- und überoptimale IES-Konzentrationen hervorgerufenen Krümmungen der Testkoleoptilen noch weiter steigert. Als Erklärung hierfür wäre etwa anzunehmen, daß im *Helianthus*-Keimling noch ein anderer Wuchsstoff außer IES vorliegt. Von AUDUS und THRESH (1955) konnte bei Chromatographie von *Helianthus*-Extrakt, der aus Sproßgewebe gewonnen worden war, mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak außer IES (R_f 0,3—0,4) ein weiterer Wuchsstoff bei R_f 0,1 bis 0,2 nachgewiesen werden.

Bei den aus der Hypokotylbasis von *Helianthus* im Licht abgefangenen Substanzen dürfte es sich hauptsächlich um Hemmstoffe handeln, die die IES-Krümmungen herabsetzen. Eine Hemmung durch übergroße Wuchsstoffkonzentrationen kommt nicht in Betracht, da die Hypokotylbasis infolge der sehr geringen Wuchsstoffleitung bei dunkel kultivierten Keimlingen nur sehr wenig Wuchsstoff abgibt. Die Verringerung der IES-Krümmungen in Kompensationstesten mit überoptimalen IES-Vorlagen durch Zusatz von Diffusat aus belichteten Pflanzen kann aber offensichtlich nicht durch IES-Photolyse in den

Pflanzen hervorgerufen worden sein, da die geringe Wuchsstoffabgabe der Pflanzen in gar keinem Verhältnis zu der reichlichen IES-Zugabe steht, so daß sich eine geringfügige Änderung der abgegebenen IES-Menge überhaupt nicht auswirken kann. Überdies müßte auf dem absteigenden Ast der IES-Wirkungskurve eine Verringerung der Wuchsstoffmenge ja gerade eine *Verstärkung* der Krümmungen zur Folge haben.

Es muß sich also um die Neubildung oder um die Aktivierung eines Hemmstoffes in der Pflanze bereits durch 2—3stündige Belichtung handeln, oder aber das Leitungssystem für diesen Hemmstoff wird infolge der Belichtung leistungsfähiger, so daß mehr davon an den Agar abgegeben wird. Auf jeden Fall muß also eine Aktivierung des Hemmstoffsystems bereits durch kurze Belichtung erfolgen.

Das Gesamtergebnis der Viehmannschen Untersuchungen (1938) konnte im Rahmen dieser Arbeit also bestätigt werden, wenn auch nicht mit der Originalmethodik und nicht im selben Ausmaß.

Die Existenz von Hemmstoffen bei *Helianthus* geht auch aus der papierchromatischen Analyse hervor. Nach Audus und Thresh (1955) hat *Helianthus* 2 Hemmstoffe, deren R_f-Werte bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak im Bereich von 0,65—0,8 und bei 0,9 liegen.

Da die durch überoptimale IES-Konzentrationen hervorgerufenen Krümmungen durch diesen Hemmstoff nicht gesteigert, sondern im Gegenteil herabgesetzt werden, ist zu vermuten, daß es sich dabei um keine in ihrer Wirksamkeit mit Wuchsstoff konkurrierende Verbindung handelt. Dieser Hemmstoff besitzt also vermutlich einen anderen Angriffspunkt auf das wachsende System. Auch eine Wirksamkeit durch Blockierung der Wuchsstoff*leitung* ist möglich. Der Hemmstoff entsteht offenbar im ganzen Hypokotyl und tritt im oberen Teil gelegentlich nur durch Verringerung der Wuchsstoffkrümmungen, im unteren dagegen durch positive Krümmungen in Erscheinung.

Mit dem Einfluß des Lichtes auf den Wuchsstoff haben sich zahlreiche Forscher befaßt. Bei der Untersuchung der oxydativen Zersetzung der IES im kurzwelligen Licht haben u.a. Fischer (1954) und Melchior (1957) eine Reihe der dabei in vitro entstehenden Zersetzungsprodukte papierelektrophoretisch und papierchromatographisch erfaßt. Ob der von mir beobachtete Hemmstoff vielleicht auch ein Abbauprodukt der IES ist, etwa der von Meyer (1958) an belichteten und mit IES versorgten Koleoptilen gefundene Indolaldehyd, ist noch nicht sicher zu sagen. Die Hemmwirkung des Indolaldehyds soll auf einer Blockierung der Wuchsstoffleitbahnen beruhen. Der Zusatz eines solchen Stoffes könnte die Krümmungen im Hafertest auch für den absteigenden Ast der Wirkungskurve herabsetzen, wie das z.B. beim ebenso wirkenden Phthalsäuremono-α-naphthylamid beobachtet worden ist. (Morgan und

SÖDING 1958.) Andererseits besitzt aber der *Helianthus*-Keimling anscheinend nur wenig Wuchsstoff, und die angewandte Lichtintensität von etwa 600 Lux — MEYER arbeitete mit 10000 Lux — ist so gering, daß eine stärkere IES-Photolyse in der Pflanze nicht recht einleuchtet. Die Frage muß daher zunächst offen bleiben.

Es liegt nahe zu vermuten, daß die von mir bereits bei kurzer Belichtung beobachtete Aktivierung des Hemmstoffsystems auch an der Herabsetzung des Längenwachstums der Pflanzen durch das Licht beteiligt ist. Diese Möglichkeit müßte jedoch erst durch weitere Untersuchungen geprüft werden.

Zusammenfassung

Hypokotylzylinder von *Helianthus annuus* wurden mit Hilfe der Agar-Abfangmethode auf ihren Wirkstoffgehalt geprüft. Aus dunkel kultivierten Keimlingen wurde Wuchsstoff während 2—3 Std in Agar abgefangen, teils im Dunkeln, teils bei Belichtung mit etwa 600 Lux. Es konnten aber nur sehr geringe Wuchsstoffmengen erhalten werden, und zwar fast nur in den Dunkelversuchen. Wurde den Agarwürfeln aber eine IES-Vorlage gegeben, so erhöhte das im Dunkeln erhaltene Diffusat die Wuchsstoffkrümmungen im Hafertest, während das im Licht erhaltene sie herabsetzte.

Aus diesen Versuchen kann auf eine Bildung oder Aktivierung eines Hemmstoffes oder aber auf eine Steigerung seiner Wanderungsfähigkeit geschlossen werden. Zur Auslösung dieses Effektes genügt bereits eine 2—3stündige Belichtung mit etwa 600 Lux.

Dem Direktor des Staatsinstituts für Allgemeine Botanik in Hamburg, Herrn Prof. Dr. W. MEVIUS, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und alle damit verbundenen Unterstützungen. Herrn Prof. Dr. H. SÖDING, der mir das Thema stellte, gilt mein besonderer Dank für sein förderndes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine hilfreichen Anregungen und Hinweise.

Literatur

AUDUS, L. J., and R. THRESH: The effects of synthetic growth substances in the level of endogenous auxins in plants. Sympos. Wye. College 1955.

BAYER, M.: Untersuchungen über die Wuchs- und Hemmstoffe der Wurzelspitze und der Plumula von *Vicia faba*. Planta (Berl.) **57**, 215 (1961).

BLAAUW-JANSEN, G.: The influence of red and far red light on the growth and phototropism of the *Avena* Seedling. Acta bot. neerl. **8**, 1—39 (1959).

FISCHER, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954).

MEIJER, G.: The spectral dependence of flowering and elongation. Acta bot. neerl. **8**, 189—246 (1959).

MELCHIOR, G. H.: Über den Abbau von Indolderivaten. I. Photolyse durch Ultraviolettes Licht. Planta (Berl.) **50**, 262—290 (1957).

MEYER, J.: Die photolytischen Abbauprodukte der 3-Indolessigsäure und ihre physiologische Wirkung auf das Wachstum der *Avena*-Koleoptile. Z. Bot. **46**, 125—160 (1958).

MORGAN, D. G., u. H. SÖDING: Über die Wirkungsweise von Phthalsäuremono-α-naphthylamid (PNA) auf das Wachstum der Haferkoleoptile. Planta (Berl.) **52**, 235—249 (1958).

RUGE, U.: Der Auxingehalt von *Tradescantia*-Blättern in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. Naturwissenschaften **47**, 381—382 (1960).

SÖDING, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952.

VIEHMANN, H.: Untersuchungen über die chemotropische Wirkung organischer Säuren. Jb. wiss. Bot. **87**, 408—435 (1938).

Dr. M. BAYER,
Wedel in Holstein, Möllers Park 14

Planta 57, 266—283 (1961)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. Ullrich)

TRÖPFCHENAUSSCHEIDUNG UND EKTODESMEN-VERTEILUNG IN ZWIEBELSCHUPPENEPIDERMEN

EIN BEITRAG ZUR FRAGE DER EKTODESMENFUNKTION*

Von

Wolfgang Franke

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1961)

I. Einleitung

Seit der Entdeckung der Ektodesmen durch Schumacher und Halbsguth (1939) und der eingehenden Untersuchung ihres Vorkommens, ihres Baues und ihrer Darstellbarkeit (Schumacher 1942, Lambertz 1954, Schumacher 1957, Schnepf 1959 und Sievers 1959) ist die Frage nach ihrer Funktion wiederholt spekulativ beantwortet worden. Schumacher und Lambertz (1956) haben als erste einen experimentellen Beitrag zur Lösung dieser Frage beigesteuert. Sie halten eine Beziehung der Ektodesmen zur Reizübertragung für möglich, wenngleich ihre Befunde auch im Sinne einer Stofftransportfunktion gedeutet werden können.

Denn die von ihnen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtete Erhöhung der Ektodesmenanzahl pro Flächeneinheit nach Auflegen von Wattebäuschen, die mit verschiedenen Substanzen getränkt waren, ist nur erklärlich, wenn die aufgebrachten Verbindungen zumindest die Cuticula der Blätter durchdrungen haben und in die Plasmasubstanz der Ektodesmen eingesickert sind. Der Effekt, nämlich der Nachweis einer vermehrten Anzahl von Ektodesmen im behandelten Blattstück, kann auf einer reizbedingten Veränderung des Plasmagefüges beruhen. Andererseits ist aber der Ektodesmennachweis bei der Sublimatmethode offenbar mit einer Reduktion des Sublimats verbunden, wofür im Ektodesmenplasma ein reduzierender Stoff vorhanden sein muß. Da in allen Versuchslösungen der Autoren Ascorbinsäure enthalten war, könnte diese nach dem Eindringen als reduzierende Verbindung das Reduktionsvermögen des Plasmas erhöht und dadurch den Nachweis einer größeren Anzahl von Ektodesmen bewirkt haben. Daß Ascorbinsäure ins Blatt eindringen kann, ist bereits nachgewiesen worden (Franke 1957). Über die Frage, ob Ascorbinsäure eine spezifische Wirkung beim Ektodesmennachweis ausübt, sind Untersuchungen noch im Gange.

Die Möglichkeit einer Funktion der Ektodesmen bei der Stoffaufnahme ist also durch die erwähnten Befunde nicht ausgeschlossen worden.

* Herrn Professor Dr. Walter Schumacher zu seinem 60. Geburtstag mit besten Wünschen gewidmet.

In einer kürzlichen Mitteilung (FRANKE 1960a) habe ich nun auf Grund eigener Beobachtungen und der Ergebnisse anderer Autoren darzulegen versucht, daß die Ektodesmen in enger Beziehung zur Stoffaufnahme und Stoffabgabe der Blätter stehen, und die Ansicht ausgesprochen, daß sie als Transportbahnen in den Epidermisaußenwänden zwischen den Protoplasten und der Cuticula der Epidermiszellen dienen. Die beigebrachten Befunde stellen jedoch nur Wahrscheinlichkeitsbeweise dar.

Der direkte Beweis für diese Auffassung könnte nun theoretisch auf mehreren Wegen erbracht werden. Zum einen ließe sich versuchen, fluorescierende oder mit radioaktiven Isotopen markierte Stoffe auf ihren Wegen bei einer Stoffaufnahme oder -abgabe zu verfolgen. Die Erfolgsaussichten dafür erscheinen gering. Denn der Nachweis fluorescierender Substanzen hängt von einer bestimmten Quantität solcher Stoffe ab. Damit ist aber die Gefahr verbunden, daß dann infolge seitlicher Auswanderung aus den Ektodesmen in die sie umgebenden Membranen hinein die Wände insgesamt aufleuchten und dadurch die Transportbahnen überstrahlen. Bei Verwendung markierter Verbindungen wiederum ist zu erwarten, daß die feinen Ektodesmen auf Radioautogrammen infolge der allseitigen Emanation der radioaktiven Partikel und wegen des Umstandes, daß die Ektodesmen in der Regel dicht beieinander stehen, ebenfalls nicht mehr isoliert erkennbar werden.

Ein anderer Weg wäre die Feststellung, ob sich die Orte von nachweisbaren Epidermisausscheidungen und Ektodesmen in ihrer Lokalisation decken.

Einen ersten Versuch zu dieser Möglichkeit habe ich bei den von STRUGGER (1939) experimentell erschlossenen „Poren" in der Blattepidermis von *Helxine soleirolii* gemacht. Dabei ließ sich nachweisen, daß Berberinsulfat, das zuvor durch Blattstiele aufgenommen worden war, durch osmotische Saugung an den Stellen der unteren Blattepidermis austrat und mit KSCN Berberinrhodanidkristalle bildete, an denen in anderen Präparaten Ektodesmen lokalisiert werden konnten (FRANKE 1960b). Dies gilt insbesondere für den Bereich der Schließzellen. Der Stofftransport in den Außenwänden vollzieht sich also in distinkten Bahnen, möglicherweise in Abhängigkeit von der Molekülgröße der transportierten Stoffe, und nicht diffus durch die gesamte Membran hindurch.

Vor kurzem habe ich nun einen weiteren Fall beschrieben (FRANKE 1961), bei dem die Deckungsgleichheit in der Lokalisation von Ausscheidungskörpern und von Ektodesmen eindeutig in Erscheinung tritt.

Es handelt sich dabei um eine Tröpfchenbildung auf der Cuticula der Epidermis von Schuppen der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.). BANCHER, HÖLZL und KLIMA (1960) haben nämlich in Wiederholung der Versuche von STRUGGER (1936) abgezogene Innenepidermen mit Neutralrotlösung behandelt und mit Deckgläschen bedeckt, um den Asphyxieeffekt, d. h. den Übertritt des Farbstoffes aus der Vacuole der Epidermiszellen, wo er zunächst gespeichert wird, in die Zellwände zu studieren. Dabei schlossen sie auch zur Beschleunigung des Effektes die Zwiebelhäutchen in

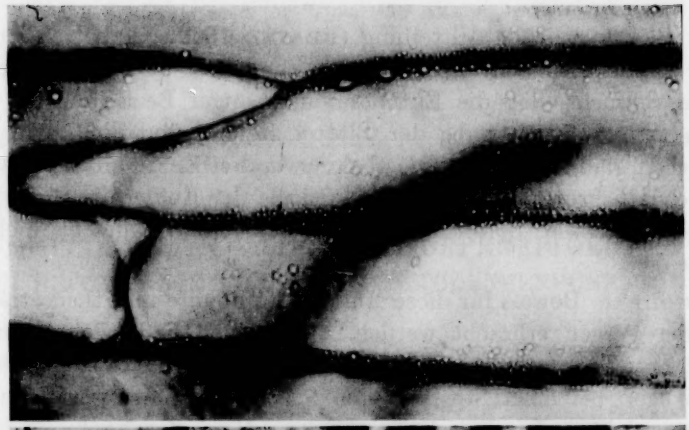


Abb. 1

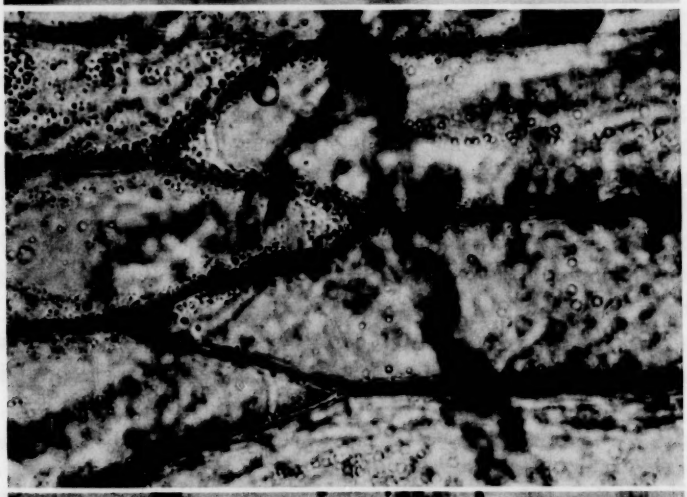


Abb. 2

Abb. 3

Abb. 1—3. (Legenden s. S. 269)

Paraffinöl ein, das den Sauerstoffzutritt verhindert. Sie beobachteten danach neben der Umlagerung des Farbstoffes in die Membranen, daß kleine wasserklare Flüssigkeitströpfchen auf der Cuticula in sehr auffälliger Verteilung auftraten, nämlich in Reihen entlang den Antiklinalwänden der Epidermiszellen. Diese sog. Antiklinaltröpfchen konnten dabei oft in mehreren parallelen Reihen erscheinen. Vereinzelte Tröpfchen fanden sich aber auch über den Periklinen. Ihre Bildung ist übrigens nicht an die Vitalfärbung gebunden, sondern kann auch in ungefärbten, in Paraffinöl eingeschlossenen Objekten wahrgenommen werden. Die Vitalität des Ausscheidungsgeschehens in den lebenden Zellen offenbarte sich in der zunehmenden Vergrößerung der Tröpfchen und ihrem Zusammenfließen. Nach den Ermittlungen von BANCHER, HÖLZL und KLIMA (1960) handelt es sich bei den beobachteten Ausscheidungen nicht etwa um Gasblasen, sondern um Tröpfchen, sehr wahrscheinlich von Wasser oder wäßrigen Lösungen.

Die Autoren diskutierten nun diese Tröpfchenbildung im Zusammenhang mit der Wasser- und Stoffdurchlässigkeit pflanzlicher Epidermen und erinnerten dabei daran, daß die cuticuläre Transpiration in besonderem Ausmaße über den Antiklinen erfolgt. Diese Antiklinentranspiration hatte ich schon mit dem Vorkommen von Ektodesmen in Beziehung gebracht (FRANKE 1960a), weil Ektodesmen z. B. in *Primulaarten* und bei *Plantago major* häufig in dichten Reihen entlang den Antiklinen angeordnet erscheinen. Es lag daher nahe zu prüfen, ob auch in der Zwiebelschuppenepidermis Ektodesmen vorkommen und wie sie verteilt sind.

Wie in der genannten Arbeit (FRANKE 1961) gezeigt worden ist, trifft in der Tat eine mit der Tröpfchenbildung völlig übereinstimmende Verteilung von Ektodesmen in Reihen, oft auch in mehreren parallelen Reihen entlang den Antiklinalwänden zu. Eingehende Untersuchungen an den Zwiebelhäutchen haben jedoch eine Anzahl weiterer Befunde erbracht, die geeignet sind, die Funktion der Ektodesmen zu klären, und die deshalb im folgenden dargelegt werden sollen.

II. Versuche und Beobachtungen

1. Methoden und Material

Für die Durchführung der Versuche zur Tröpfchenbildung mittels Neutralrotfärbung wurden die Methoden und Erfahrungen von STRUGGER (1936) verwendet. Der Ektodesmennachweis erfolgte nach der bewährten Sublimatmethode mit Pyoktaninfärbung nach LAMBERTZ (1954) und SCHNEPF (1959). Zur Untersuchung kamen sowohl Aufsichtspräparate der abgezogenen inneren und äußeren Epidermen als auch Querschnitte durch die Zwiebelschuppen.

Als Material dienten Küchenzwiebeln (*Allium cepa* L.) verschiedener Herkünfte, die im Handel bezogen wurden.

Abb. 1. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Sehr kleine Tröpfchen in Reihen über den Antiklinen (510mal)

Abb. 2. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Kleinere und größere Tröpfchen in Reihen über den Antiklinen, zerstreute Tröpfchen auch über den Periklinen (ein etwas späteres Stadium zu Abb. 1). (256mal)

Abb. 3. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Ektodesmen in Reihen entlang den Antiklinen, vereinzelte Ektodesmen auch in den Periklinen (205mal)

2. *Tröpfchenbildung*

a) Innere (adaxiale) Epidermis, Aufsichtspräparate. Wie BANCHER, HÖLZL und KLIMA (1960) beschrieben haben, setzt die Tröpfchenbildung wenige Minuten nach dem Einschließen der mit Neutralrot gefärbten

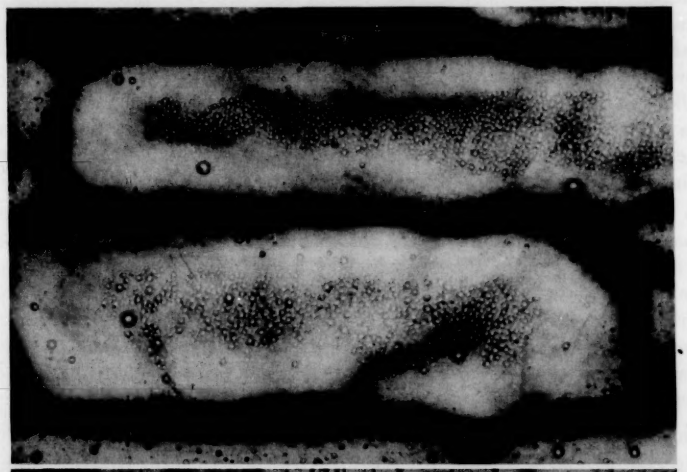


Abb. 4

Abb. 5

Abb. 4. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Tröpfchen zu dichten Gruppen über den Periklinen massiert (256mal)

Abb. 5. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Ektodesmen zu dichten Gruppen in den Periklinen vereint (256mal)

Zwiebelhäutchen in Paraffinöl ein. Zur gleichen Zeit beginnt die Umlagerung des Farbstoffes aus den Vacuolen in die Membranen. Zuerst treten winzige Tröpfchen auf (Abb. 1), die sich im Verlaufe einiger Zeit vergrößern und dann zu größeren Tropfen zusammenfließen können [Abb. 2, vgl. auch FRANKE (1961) Abb. 2]. Später entstehen noch größere Aggregate, wobei diese untereinander durch fädige Bildungen verbunden sein können. Man gewinnt den Eindruck, als ob die Flüssigkeit etwas viscös ist.

Charakteristisch ist nun die Verteilung der Tröpfchen. Nach BANCHER, HÖLZL und KLIMA fällt zuerst die regelmäßige Anordnung z.T. in mehreren parallelen Reihen entlang den Antiklinen (radialen Wänden) auf (Abb. 1 u. 2). Daneben finden sich nach einiger Zeit auch locker verstreute Tröpfchen über den periklinalen (frontalen) Wänden (Abb. 2). Bei der sorgfältigen Durchmusterung der etwa 1 cm² großen Epidermis-

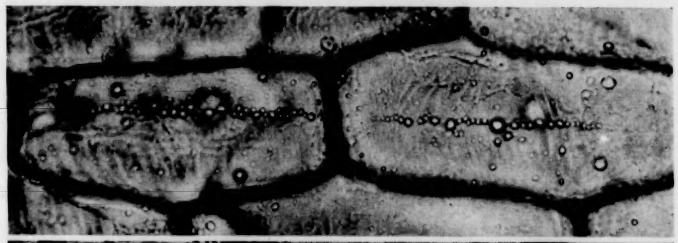


Abb. 6

Abb. 7

Abb. 6. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Tröpfchen zu einer geraden Reihe über 2 Zellen hinweg über den Periklinen angeordnet (256mal)

Abb. 7. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Ektodesmen in den Periklinen zu Ketten gereiht, z.T. über 2 Zellen hinwegreichend (205mal)

stücke ist jedoch zu bemerken, daß die Tröpfchen durchaus nicht überall vorwiegend über den Antiklinen vorkommen. Vielmehr bietet sich ein stellenweise unterschiedliches Bild dar. So läßt sich beispielsweise beobachten, daß einzelne Zellen oder öfter Komplexe mehrerer Zellen völlig frei von Tröpfchen sind. Auch bei längerem Warten entstehen dann an diesen Stellen keine Ausscheidungen. In anderen Bezirken wiederum treten die Tröpfchen überwiegend oder gar ausschließlich über den Periklinen auf und sind entweder locker verstreut oder zu dichten Gruppen vereinigt (Abb. 4). Besonders eindrucksvoll ist die Beobachtung von Tröpfchenketten über den Periklinen, die teils mehr oder weniger schnurgerade (Abb. 6), teils bogig geschwungen entweder parallel zu den Längswandantiklinen oder schräg bis fast senkrecht dazu verlaufen

(Abb. 6). Eine Kette kann dabei über mehrere Zellen hinwegreichen oder aber jeweils über den Antiklinen unterbrochen sein und sich erst in der folgenden Zelle, aber in gleicher Richtung fortsetzen (Abb. 8). Oft

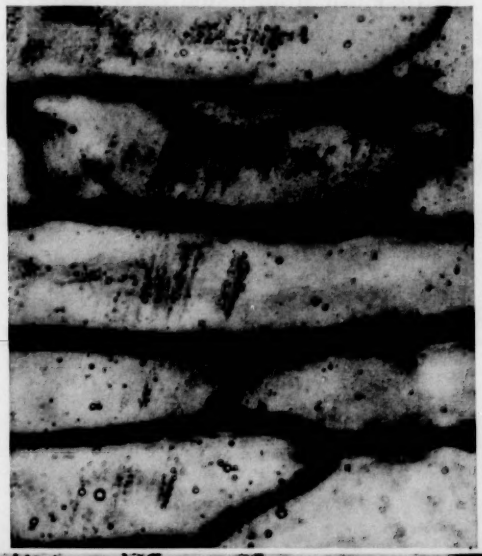


Abb. 8

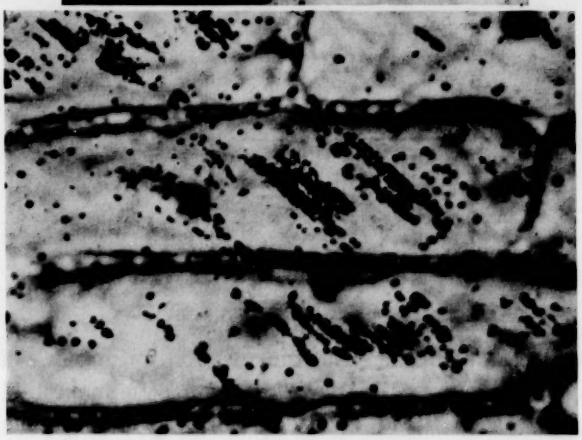


Abb. 9

Abb. 8. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Tröpfchen zu Kettengruppen vereinigt, die über die Periklinen mehrerer Zellen hinwegführen (160mal)

Abb. 9. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Ektodesmen zu Kettengruppen vereinigt, die sich in den Periklinen mehrerer Zellen fortsetzen (256mal)

sind solche Ketten zu parallelen Gruppen vereinigt und erscheinen wie mit einem Pinsel hingewischt (Abb. 8). Zuweilen kreuzen sich die Ketten bei verschiedener Richtung (Abb. 10).

Es muß erwähnt werden, daß die Tröpfchenaspekte bei Epidermen verschiedener Zwiebelindividuen, aber offenbar auch in Abhängigkeit von der Sorte unterschied-

lich sein können. Während in manchen Präparaten die antiklinale Anordnung fast ausschließlich erscheint, ist sie in anderen weniger häufig, und die Verteilung über den Periklinen tritt stärker hervor oder die Tröpfchen sind überhaupt spärlicher ausgebildet. Für die Präparate wurden stets mittlere Schuppen verwendet. Im allgemeinen läßt sich jedoch feststellen, daß bei der inneren Epidermis die Anordnung in dichten Reihen über den Antiklinen vorherrscht.

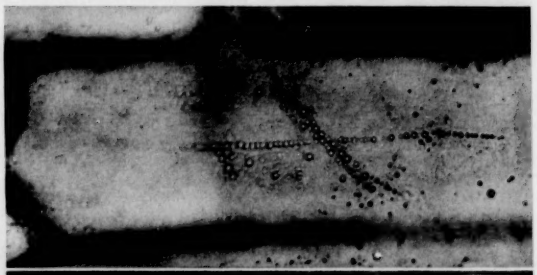


Abb.10

Abb.11

Abb. 10. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Zwei sich kreuzende Tröpfchenketten über einer Periklinen (256mal)

Abb. 11. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Zwei sich kreuzende Ektodesmenketten in einer periklinalen Wand (256mal)

Daß es sich bei den Tröpfchen in der Tat um Ausscheidungen der Epidermis handelt, die über die Cuticula hinaustreten, konnte dadurch belegt werden, daß in einigen Präparaten die Epidermis beim Auflegen auf den Objektträger nach unten umgefaltelt worden war und entlang der Faltkante sich die Tröpfchen in Seitenansicht boten (Abb. 12).

b) Äußere (abaxiale) Epidermis, Aufsichtspräparate. Die äußere Epidermis der Zwiebelschuppe, die morphologisch der unteren Epidermis eines Blattes entspricht, ist gegenüber den langgestreckten Zellen

Abb. 12. Aufsicht auf eine Faltkante einer Zwiebelschuppeninnenepidermis: Seitenansicht der über die Cuticula ausgeschiedenen Tröpfchen (400mal)

der inneren Epidermis durch meist kürzere Zellen gekennzeichnet. Einige wenige unvollständige Schließzellen sind zu beobachten. Auch hier treten beim Einbetten in Paraffinöl über der Cuticula Tröpfchenbildungen in Erscheinung. Im Gegensatz zur inneren Epidermis ist jedoch die

Anordnung entlang den Antiklinen seltener. Statt dessen sind die Tröpfchen, wie BANCHER, HÖLZL und KLIMA (1960) bereits berichtet haben, vorwiegend über den Periklinen in meist zerstreuter Anordnung wahr-

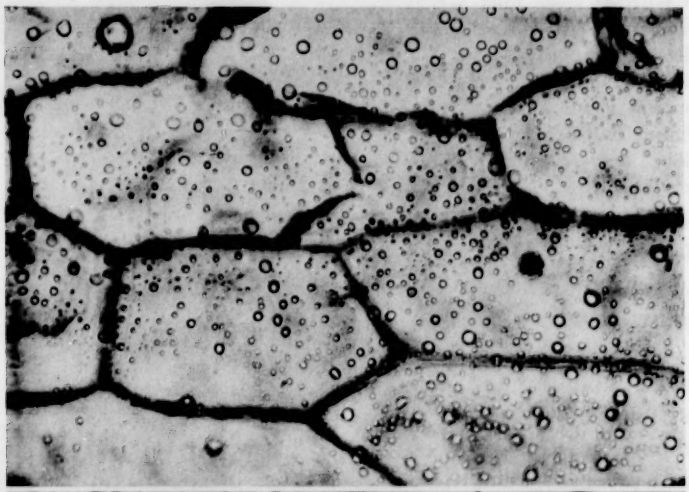


Abb. 13

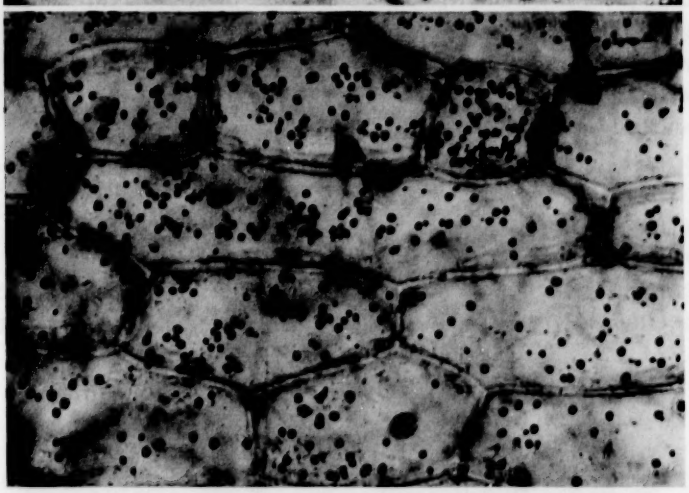


Abb. 14

Abb. 13. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Zerstreute Anordnung von Tröpfchen über Peri- und Antiklinen (256mal)

Abb. 14. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Zerstreute Anordnung von Ektodesmen in Peri- und Antiklinen (256mal)

zunehmen (Abb. 13). Zuweilen bilden sie auch dichte Gruppen, manchmal ein tröpfchenfreies Zentrum umschließende breite Kränze, und fehlen dann zum Teil völlig über den Antiklinen. Doch finden sich auch hier über einzelnen Zellen oder Zellkomplexen überhaupt keine Tröpfchen,

während sich in anderen Bezirken wieder die auffälligen Ketten und Kettengruppen über den Periklinen darbieten, wie wir sie bereits beschrieben haben (Abb. 6, 8 u. 10).

3. Ektodesmenverteilung

a) Innere Epidermis, Aufsichtspräparate. Bei der Prüfung der mit dem Sublimatverfahren gewonnenen Ektodesmenpräparate hatte unser Augenmerk zuerst hauptsächlich der Verteilung der in großer Zahl vor-

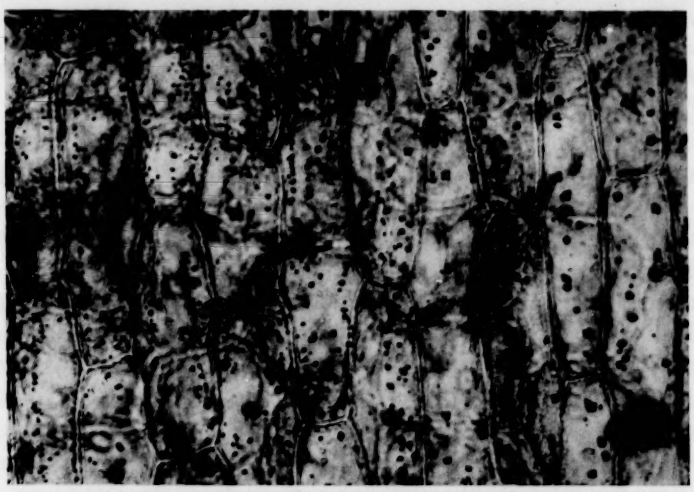


Abb. 15. Aufsicht auf die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe: Übergang von großen zu kleinen Ektodesmen innerhalb weniger benachbarter Zellen (160mal)

handenen Ektodesmen entlang den Antiklinen gegolten. Wie die Abb. 3 zeigt, deckt sich diese Verteilung eindeutig mit der der Tröpfchen [Abb. 1 u. 2, vgl. auch FRANKE (1961) Abb. 1 u. 2 und BANCHER u. Mitarb. (1960) Abb. 1 u. 2]. Bei der eingehenden Durchmusterung zahlreicher Ektodesmenpräparate konnten wir aber feststellen, daß auch hier neben dieser typischen Anordnung in einzelnen Zellen oder Zellgruppen Ektodesmen völlig fehlen können, daß außer den die Antiklinen begleitenden Ektodesmen fast stets einige locker verstreute in den Periklinen auftreten und daß zuweilen die Ektodesmen in einzelnen Zellen oder Zellkomplexen zu dichten Gruppen oft ausschließlich in den Periklinen angeordnet sind (Abb. 5). Im Ganzen ergab sich also eine mit den Tröpfchenmustern übereinstimmende Verteilung der Ektodesmen, Die Probe auf's Exempel lieferten endlich die Beobachtungen von Ektodesmenketten in der gleichen Figurierung wie die Tröpfchenketten (Abb. 7). Selbst die wie mit einem Pinsel hingewischten Gruppen von Ketten (Abb. 9) und die gekreuzten Ketten (Abb. 11) kehrten wieder.

Die Ektodesmen sind teilweise als grobe dicke Punkte, teilweise als feinere und dann oft dicht beieinander stehende Pünktchen in den Aufsichtspräparaten zu erkennen. Es gibt aber auch Aspekte, in denen von Zelle zu Zelle Übergänge von großen dicken Punkten zu sehr feinen Pünktchen wahrzunehmen sind (Abb. 15), so daß Bedenken ausgeräumt werden, es könne sich hier um verschiedenartige Strukturen oder gar um oberflächlich aufgelagerte gefärbte Partikel handeln. Von den durch Pyoktanin mehr violett oder bräunlich gefärbten Ektodesmen unterscheiden sich Plasmaeinschlüsse in den die Vacuolen durchziehenden Plasmasträngen und in den der Wand anliegenden Plasmaschläuchen nicht nur durch die etwas andere Blaufärbung, sondern deutlich auch durch die räumliche Verteilung. Denn sie liegen unter der Zellwand im Zellumen und erscheinen niemals in der gleichen optischen Ebene wie die Ektodesmen. Braunschwarze verkrümmt-sternförmige Strukturen, die gelegentlich und dann nur in einzelnen Zellen in der Außenwand und zugleich in der Innenwand in großer Anzahl auftreten, konnten bisher nicht identifiziert werden.

b) Äußere Epidermis, Aufsichtspräparate. Die Prüfung der Außenepidermis der Zwiebelschuppen auf das Vorkommen von Ektodesmen liefert einen weiteren Beweis für die kongruente Lokalisierung von Tröpfchen und Ektodesmen. Denn wie schon für die Tröpfchenbildung beschrieben, bestätigt sich hier der Unterschied gegenüber der Innenepidermis, daß nämlich die Anordnung der Ektodesmen entlang den Antiklinen viel seltener ist. Die Ektodesmen sind vielmehr vorwiegend unregelmäßig dichter oder lockerer in Peri- und Antiklinen verstreut (Abb. 14) oder sind häufiger ausschließlich in den Periklinen massiert. Ebenso kommen kleinere oder größere ektodesmenfreie Bezirke und wiederum die auffälligen Kettenanordnungen vor. In den wenigen funktionsunfähigen Schließzellen ist im Gegensatz zu *Plantago major*, *Helxine soleirolii* u.a. Arten (FRANKE 1960a u. b) keine Häufung von Ektodesmen zu bemerken.

c) Querschnittspräparate. Um uns zu überzeugen, daß wir es bei den beobachteten Strukturen tatsächlich mit Ektodesmen zu tun haben, fertigten wir zahlreiche Querschnitte an. Die Ektodesmen müssen sich bekanntlich durch die Zellwand hindurch erstrecken. Die Beobachtungen an der Innenepidermis waren etwas erschwert, weil sich diese nach dem Schneiden mit dem Gefriermikrotom sehr leicht vom Mesophyll trennt. Die äußere Epidermis bleibt dagegen stets mit dem subepidermalen Gewebe fest verbunden. In Schnitten parallel zu den antiklinalen Längswänden fanden wir in der Innenepidermis gelegentlich lange Reihen von meist kurzen dickkeilförmigen, aber zuweilen auch stäbchenförmigen Ektodesmen, die den Reihen entlang den Antiklinen entsprechen konnten (Abb. 16). Die ersteren reichten nur selten bis ans Lumen heran und besaßen zumeist nur eine Länge von $^3/_{10}$ der Zellwandstärke. Die verkürzten Formen mögen allerdings durch die sehr starke Quellung der Wände bedingt sein. In den Außenwänden der äußeren Epidermen sind häufiger länger gestreckte Ektodesmen anzutreffen, die entweder

$^5/_{10}$—$^7/_{10}$ der Zellwandstärke erreichen oder von der Cuticula bis zum Lumen durchragen (Abb. 17). In Schnitten quer zu den antiklinalen Längswänden der inneren Epidermis sind Ektodesmen dort, wo sie in typischer Weise entlang den Antiklinen angeordnet sind, beiderseits der antiklinalen Wände zu erwarten. Das traf, obschon seltener, zu. Meist

Abb. 16. Zwiebelhäutchen (innere Epidermis) aufgerissen, so daß die Ektodesmen in Seitenansicht zu sehen sind (640mal)

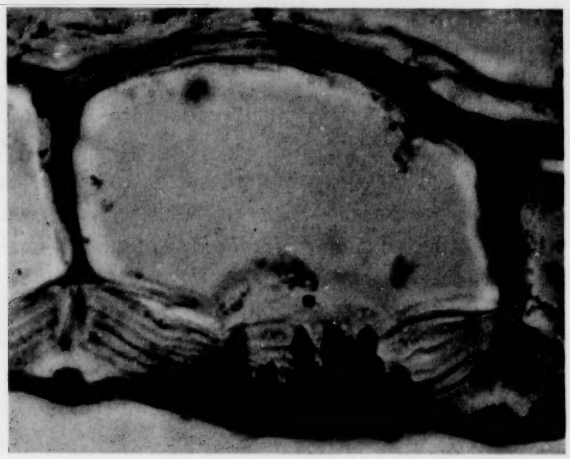


Abb. 17. Querschnitt durch die äußere Epidermis einer Zwiebelschuppe: Ektodesmen in dichter Gruppe in einer periklinalen Wand (deutliche Wandquellung) (512mal)

sind in den Präparaten vor allem bei der äußeren Epidermis wenige bis viele Ektodesmen in den periklinalen Wänden zu erkennen (Abb. 17).

Kurze Cutinzapfen, die gelegentlich in den Antiklinalwänden zu beobachten sind und die ebenfalls bläulich gefärbt erscheinen, dürfen freilich nicht mit Ektodesmen verwechselt werden. Ganz selten nur waren oberflächlich aufgelagerte gefärbte Partikel wahrzunehmen, so daß solche nicht für die in den Aufsichten so reichlich vertretenen Strukturen verantwortlich zu machen sind. Die schon erwähnten braunschwarzen gekrümmt-sternförmigen Gebilde im Bereiche von Außen- und zugleich Innenwand in stets nur vereinzelten Epidermiszellen konnten auch in Querschnitten, jetzt als krallenartige Bildungen, beobachtet werden. Sie stellen jedoch weder Ekto- noch Plasmodesmen dar.

Auf Grund dieser Querschnittsuntersuchung können wir mit Sicherheit sagen, daß die in den Aufsichtspräparaten festgestellten Strukturen in der Tat Ektodesmen sind.

III. Diskussion der Ergebnisse

Die hier dargestellten Beobachtungen bestätigen, daß unter den Bedingungen der Paraffinöleinbettung aus ungefärbten wie aus mit Neutralrot gefärbten Zwiebelepidermiszellen Tröpfchen über der Cuticula austreten. Daß es sich um eine Flüssigkeitsausscheidung handelt, beweist die Abb. 12. Denn die Umrisse der Bläschen verjüngen sich fast stielartig gegen die Cuticula zu und bleiben mit der Ausscheidungsstelle solange in Verbindung, wie die Tropfen sich nicht miteinander vereinigen oder durch derbe Erschütterung mechanisch gelöst werden. Würde es sich um Gasblasen handeln, so müßten ihre Umrisse vollkommene Kugelgestalt besitzen und sich die Bläschen auch bei fehlender Erschütterung allmählich von der Cuticula lösen. BANCHER, HÖLZL und KLIMA (1960) halten die Ausscheidungen für Wassertröpfchen, da das Verhalten der Beckeschen Linie ein anderes war als bei künstlich eingebrachten Luftblasen. Wir werden unten einen weiteren Beweis für den flüssigen Aggregatzustand erbringen.

Die punktartige Lokalisierung der Tröpfchen — bei der Innenepidermis vorherrschend in Reihen dicht beiderseits der Antiklinen und bei der äußeren Epidermis vorwiegend zerstreut über den Periklinen — macht zunächst deutlich, daß distinkte Ausscheidungsorte bestehen und nicht etwa eine diffuse Exkretion über die gesamte Außenwand erfolgt. Weiterhin weist die Übereinstimmung der Lokalisation der Tröpfchen mit der der Ektodesmen entlang den Antiklinen (Abb. 1, 2 u. 3) auf eine Identität der Ausscheidungsorte mit den distalen Enden der Ektodesmen an der Cuticula hin. Querschnitte durch die Zwiebelschuppen beweisen, daß die in den Aufsichten als Punkte wahrnehmbaren Strukturen in der Tat die Außenwände durchragende Ektodesmen sind (Abb. 16 u. 17). Die Kongruenz der merkwürdigen Tröpfchenketten (Abb. 6 u. 7), der Kettengruppen (Abb. 8 u. 9) und der Kettenüberkreuzungen (Abb. 10 u. 11) mit einer ebensolchen Verteilung der Ektodesmen, ferner das Vorkommen tröpfchen- wie ektodesmenfreier Bezirke und die gleiche Unterschiedlichkeit zwischen innerer und äußerer Epidermis bezüglich der überwiegenden Anordnung von Tröpfchen wie von Ektodesmen (Abb. 1, 2 u. 3 sowie Abb. 13 u. 14) lassen keinen Zweifel mehr daran, daß die Flüssigkeitsausscheidungen aus denjenigen Orten austreten, an denen auch Ektodesmen nachweisbar sind.

Damit ist aber unserer oben aufgestellten Forderung auf deckungsgleiche Übereinstimmung in der Lokalisation von nachweisbaren ausgeschiedenen Substanzen und der Ektodesmen genüge getan. Ich möchte daher die Theorie als bewiesen ansehen, daß die Ektodesmen mindestens die *eine* Funktion ausüben, nämlich als Transportbahnen bei Ausscheidungsvorgängen vom Protoplasten der Epidermiszellen bis an oder in die Cuticula zu dienen. Diese Feststellung erfährt eine bedeutsame

Bestätigung durch die folgende Beobachtung. In einigen Versuchen, in denen der Übertritt des Neutralrotes aus der Vacuole in die Membranen nach Einbettung in Paraffinöl aus noch unbekannten Gründen sehr rasch erfolgte, traten nämlich an Stelle der sonst wasserklaren Tröpfchen tief rot gefärbte Tropfen über den Antiklinen aus (Abb. 18). Die

Abb. 18

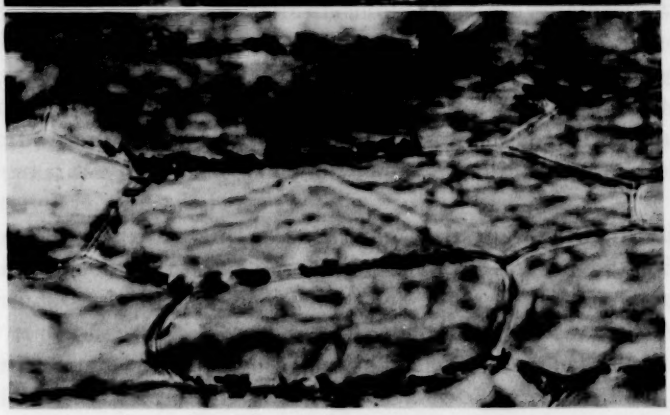


Abb. 19

Abb. 18. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Dunkelrot gefärbte Tropfen über den Antiklinen (256mal)

Abb. 19. Aufsicht auf die Innenepidermis einer Zwiebelschuppe: Dasselbe Präparat wie Abb. 18 nach etwa 24 Std. Die Tropfen sind auskristallisiert (256mal)

Farbstoffkonzentration war in ihnen offenbar so hoch, daß nach etwa 24 Std der Farbstoff zu Prismen und Nadeln auskristallisierte (Abb. 19). Demnach ist hier aus der Vacuole über den Plasmaschlauch der Epidermiszelle und durch die Ektodesmen der Außenwand hindurch eine Lösung ausgetreten, und es liegt eindeutig ein — sicher extremer — Fall von cuticulärer Rekretion vor, der offensichtlich an das Vorhandensein von Ektodesmen gebunden ist. Dazu sei noch bemerkt, daß die Präparate nach dem Farbbad zweimal gründlich mit Wasser gespült wurden, bevor sie in Paraffinöl eingebettet wurden. Daher kann nicht äußerlich anhaftender Farbstoff die Ursache der gefärbten Tropfen und

der Kristalle gewesen sein. Zugleich ist damit weiterhin bewiesen, daß die Ausscheidungen Flüssigkeitstropfen sind, da in ihnen der Farbstoff gelöst ist.

Wir können nun die oben gemachte Aussage dahingehend erweitern, daß die Ektodesmen in der Zwiebelschuppenepidermis als Transportbahnen für die Ausscheidung nicht nur von Wasser sondern auch von Lösungen dienen können.

Einige Kritiker haben darauf verwiesen, daß es bisher noch nicht gelungen sei, die Feinstrukturen von Plasma, Plasmagrenzschichten und Plasmaeinschlüssen in Ektodesmen elektronenoptisch nachzuweisen, wie dies jetzt für Tüpfelkanäle in Siebplatten gelungen ist (KOLLMANN 1960, ZIEGLER 1960). Das ist nicht zu bestreiten, doch ist zu bedenken, daß auch für Plasmodesmen der Nachweis des submikroskopischen Feinbaues noch nicht eindeutig ist (vgl. KRULL 1960), wenn auch mittels des Elektronenmikroskopes mehrfach beobachtet worden ist, daß Elemente des endoplasmatischen Reticulums in die Plasmodesmen einzumünden scheinen (SITTE 1961, BUVAT 1961). Um so mehr ist angesichts der Sonderstellung, die die Ektodesmen gegenüber Plasmodesmen schon hinsichtlich ihrer Nachweisbarkeit einnehmen, zu erwarten, daß die elektronenoptischen Untersuchungen solcher im Lebenszustand ohnehin schon sehr feinen Strukturen mit besonderen Schwierigkeiten verbunden sind.

Weiterhin könnte eingewendet werden, daß die in Querschnitten beobachteten Strukturen, die häufig die Außenwand nur zum Teil durchragen und seltener von der Cuticula bis zum Protoplasten reichen, gar nicht insgesamt als durchgehende Plasmabahnen für einen Transport in Frage kommen können. Dieser Einwand kann damit entkräftet werden, daß in den Epidermen anderer Pflanzenarten ebenfalls häufig aus bisher noch nicht genau bekannten Gründen neben vielen durchgehenden auch zahlreiche verkürzte Ektodesmen wahrzunehmen sind. Die Nachweismethode ist eben noch zu grob, und die starke Quellung der Zellwände (Abb. 17) mag zu einem erheblichen Anteil an einem Abreißen der Ektodesmen vom Protoplasten der Epidermiszelle beteiligt sein. Möglicherweise ist aber auch der physiologische Zustand der Blätter zum Zeitpunkt des Versuches von Bedeutung für den Grad der Nachweisbarkeit hinsichtlich Farbintensität und der Länge der Ektodesemen (vgl. SCHNEPF 1959).

Abschließend ist festzustellen, daß mit den hier geschilderten Befunden an der Zwiebelschuppenepidermis und den Beobachtungen an *Helxine soleirolii* (FRANKE 1960b) bereits 2 Fälle vorliegen, in denen der Zusammenhang einer Ausscheidung mit dem Vorkommen von Ektodesmen demonstriert worden ist. Eine Verallgemeinerung der Gültigkeit der genannten Ektodesmenfunktion auf alle Pflanzen, die Ekto-

desmen besitzen, dürfte daher weitgehend berechtigt sein, da sie auf einer gesicherten Grundlage beruht. Und es darf weiterhin mit gutem Grund angenommen werden, daß die Transportbahnfunktion der Ektodesmen nicht nur auf Stoffabgabevorgänge beschränkt ist, sondern auch für den umgekehrten Vorgang der Stoffaufnahme zutrifft, d.h. daß der Stoffaustausch in beiden Richtungen, also Stoffaufnahme durch Blätter, cuticuläre Transpiration und cuticuläre Exkretion, zumindest in einem bestimmten Ausmaß an die Ektodesmen geknüpft ist.

Zusammenfassung

1. Beobachtungen von Bancher, Hölzl und Klima (1960), daß von isolierten und mit Neutralrot gefärbten lebenden Epidermen der Zwiebelschuppen nach Einbettung in Paraffinöl Flüssigkeitströpfchen, bei Innenepidermen vor allem über der Cuticula entlang den antiklinalen Wänden, ausgeschieden werden, können bestätigt werden. Darüber hinaus wird festgestellt, daß manche Epidermisbezirke frei von Tröpfchen sind, daß auch über den Periklinen verstreute Tröpfchen, manchmal in deutlicher Massierung, auftreten und daß ferner häufig Aneinanderreihungen der Tröpfchen zu einzelnen geraden oder sich überkreuzenden Ketten oder Kettengruppen über den Periklinen wahrzunehmen sind. Die Innen- und Außenepidermen der Schuppen unterscheiden sich charakteristisch in der Verteilung der Tröpfchen.

2. In Epidermisaufsichtspräparaten, in denen mit der Sublimatmethode Ektodesmen nachgewiesen werden, sind die gleichen Verteilungsmuster für Ektodesmen wiederzufinden, wie sie für die Tröpfchen zutreffen. Die Übereinstimmung gilt für die äußere und die innere Epidermis der Zwiebelschuppen. Querschnittspräparate erweisen, daß die in den Aufsichtspräparaten als Punkte erkennbaren Strukturen die Außenwände mehr oder weniger durchragende Ektodesmen sind.

3. In der eindeutigen Übereinstimmung der verschiedenen Lokalisationsmuster der Tröpfchen mit denen der Ektodesmen wird der Beweis erblickt, daß die Ektodesmen an der Cuticula der Membranen die Austrittsorte der Flüssigkeitsausscheidungen der Epidermiszellen sind.

4. Die gelegentliche Ausscheidung rot gefärbter Tropfen, in denen nach einiger Zeit Kristalle entstehen, beweist, daß nicht nur Wasser, sondern auch Lösungen auf diesem Wege ausgeschieden werden können.

5. Daraus wird gefolgert, daß die Ektodesmen in Zwiebelepidermen und wahrscheinlich in allen Blättern, die Ektodesmen besitzen, zumindest die *eine* Funktion ausüben, als Transportbahnen für Wasser und Lösungen bei der cuticulären Transpiration und der cuticulären Exkretion zu dienen. Es ist aber auch anzunehmen, daß die Ektodesmen die gleiche Funktion beim umgekehrten Transport von der Cuticula in die Protoplasten hinein, also bei der Stoffaufnahme durch Blätter, ausüben.

Summary

When strips of the living epidermis of bulb scales are stained with neutral red and mounted in paraffin oil, it is seen that droplets are excreted above the cuticle either in lines along the anticlinal walls, or scattered or joined together over the periclinal walls, or forming straight chains, which run individually or in parallel lines, sometimes with some crossings, over the cuticle. Some areas are found to be entirely devoid of surface droplets. There exists a characteristic difference between the distribution of droplets on the inner and the outer epidermis.

The same patterns of distribution are found, if ectodesmata in the outer walls are demonstrated with the mercury chloride method. The identical distribution of droplets and ectodesmata is a strong proof that liquids are excreted to the cuticle of epidermal cells through the walls, where ectodesmata are localized.

Red droplets, which after some hours give rise to crystals, are occasionally excreted and indicate that not only water but also solutions may be excreted in this way. It thus follows that in the epidermis of bulb scales, and probably in all leaves which possess ectodesmata, one function of the ectodesmata will be to serve as transport ways for water and dissolved substances during cuticular transpiration and cuticular excretion. It is also assumed that the ectodesmata will function as pathways during foliar absorption for the transport of substances from the cuticle to the protoplasts of epidermal cells.

Literatur

BANCHER, E., J. HÖLZL u. J. KLIMA: Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Kutikula der Zwiebelschuppe von *Allium cepa*. Protoplasma (Wien) **52**, 247—259 (1960).

BUVAT, R.: Sur le reticulum endoplasmique dans la cellule végétale. Vortrag, gehalten auf der Tagung der Dtsch. Botanischen Ges. in Halle (Saale) 1961.

FRANKE, W.: Ein Beitrag zur Nährstoffaufnahme durch Blätter. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 297—304 (1957).

— Über Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. I. Mitt. Beobachtungen an *Plantago major* L. Planta (Berl.) **55**, 390—423 (1960a).

— II. Mitt. Beobachtungen an *Helxine soleirolii* Req. Planta (Berl.) **55**, 533—541 (1960b).

— Untersuchungen zur Frage nach der Funktion der Ektodesmen. Naturwissenschaften **48**, 227—228 (1961).

KOLLMANN, R.: Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora coerulea*. II. Mitt. Elektronenoptische Untersuchungen. Planta (Berl.) **55**, 67—107 (1960).

KRULL, R.: Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album*. Planta (Berl.) **55**, 598—629 (1960).

LAMBERTZ, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954).

SCHNEPF, E.: Untersuchungen über Darstellung und Bau der Ektodesmen und ihre Beeinflußbarkeit durch stoffliche Faktoren. Planta (Berl.) **52**, 644—708 (1959).

SCHUMACHER, W.: Über plasmodesmenartige Strukturen in den Epidermisaußenwänden. Jb. wiss. Bot. **90**, 530—545 (1942).

— Über Ektodesmen und Plasmodesmen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 335—342 (1957).

—, u. W. HALBSGUTH: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Ein Beitrag zum Plasmodesmenproblem. Jb. wiss. Bot. **87**, 324—355 (1939).

Schumacher, W., u. P. Lambertz: Über die Beziehungen zwischen der Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Außenwänden. Planta (Berl.) **47**, 47—52 (1956).

Sievers, A.: Untersuchungen über die Darstellbarkeit der Ektodesmen und ihre Beeinflussung durch physikalische Faktoren. Flora (Jena) **147**, 263—316 (1959).

Sitte, P.: Die submikroskopische Organisation der Pflanzenzelle. Ber. dtsch. Bot. Ges. **74**, 177—206 (1961).

Strugger, S.: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma (Wien) **26**, 54—69 (1936).

— Die luminiszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. III. Mitt. Untersuchungen an *Helxine soleirolii* Req. Biol. Zbl. **59**, 409—442 (1939).

Ziegler, H.: Untersuchungen über die Feinstruktur des Phloems. I. Mitt. Die Siebplatten bei *Heracleum mantegazzianum* Somm. et Lev. Planta (Berl.) **55**, 1—12 (1960).

Privatdozent Dr. Wolfgang Franke,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn,
Meckenheimer Allee 176

Planta 57, 284—312 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universtität Kiel

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUR WÄRMEAKTIVIERUNG DER SPORANGIOSPOREN VON *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS*

III. Mitteilung

Von

HANSJÖRG RUDOLPH

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Juli 1961)

Über die keimungsfördernde Wirkung eines Wärmeschocks auf Saatgut, Bakterien, Pilzsporen usw. ist vielfach berichtet worden (z. B. RUGE 1955: EVANS und CURRAN 1943; SHEAR und DODGE 1927 u. a.). Eine Kausalanalyse der dabei ablaufenden Prozesse, die die Überwindung des Ruhezustandes zur Folge haben, ist allerdings meines Wissens noch nirgends gelungen. Erfolgversprechend in dieser Hinsicht erscheinen die Experimente an *Neurospora*-Ascosporen und den Sporen von *Phycomyces blakesleeanus*. Besonders gut läßt sich bei diesen Objekten die Keimruhe durch eine Wärmevorbehandlung brechen (SHEAR und DODGE 1927; GODDARD 1935, 1939; GODDARD und SMITH 1938; ROBBINS et al. 1942; SOMMER und HALBSGUTH 1957). Bei *Neurospora*-Ascosporen wurde das Problem von SUSSMAN u. Mitarb. in den letzten Jahren weiterverfolgt. HALBSGUTH und RUDOLPH haben die Kausalanalyse dieser Frage an den Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* in Angriff genommen.

Dabei hat sich für *Neurospora*-Ascosporen im Rahmen der Untersuchungen von SUSSMAN u. Mitarb. (1956) bezüglich der Goddardschen Vorstellung — daß die Wärmewirkung in der Aktivierung der Carboxylase besteht — ergeben, daß diese Interpretation der experimentellen Befunde nicht haltbar ist. Die fast völlige Gleichwertigkeit des Co- und Apoenzyms in ruhendem und wärmevorbehandeltem Sporenmaterial ist mit einer Schlüsselstellung der Carboxylase beim Aktivierungsprozeß nicht vereinbar. Der Ruhezustand der Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* soll nach ROBBINS et al. (1942) durch das Fehlen aktiver Z-Faktoren (ROBBINS, ROBBINS u. Mitarb. 1939—1942) bedingt sein. Pyridin, Acetat, Wärmevorbehandlung usw. würden nach der Robbinsschen Hypothese nur indirekt, durch Bereitstellung von Z-Faktoren wirksam werden. Die Überlegungen, die zu dieser Hypothese führen, sind aber nicht zwingend. Darauf habe ich an anderer Stelle bereits hingewiesen (RUDOLPH 1960a).

Zweifelsohne sind die Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus* zu solchen Untersuchungen besonders gut geeignet; einmal sind sie zu

gewünschten Terminen in großen Mengen abzuernten, zum anderen ist der Pilz in einem exakt definierten Substrat kultivierbar, was den Vorteil hat, daß das im Experiment beobachtete, keimungsphysiologische Verhalten der Sporen den natürlichen Bedingungen weitaus mehr entspricht, als dies bei keimungsphysiologischen Versuchen in destilliertem Wasser bzw. Puffer der Fall ist, auch selbst dann, wenn die Sporen relativ große Mengen an Reservesubstanzen enthalten. Darüber hinaus genügt bereits eine Wärmevorbehandlungsdauer von 3 min, um den Keimprozentsatz von 1,5%[1] auf >95% zu erhöhen. Die letztgenannte Eigenschaft ist für eine erfolgreiche Analyse besonders bedeutsam, denn es ist wichtig, durch eine kurze Vorbehandlung möglichst alle Sporen zu aktivieren; wären die Schwellenwerte sehr unterschiedlich und infolge davon eine längere Vorbehandlung notwendig, dann hätte man möglicherweise nach der Aktivierung völlig heterogenes Material im Versuch, und erste Reaktionen auf den Wärmeschock könnten überlagert sein. Auf Grund der vorliegenden Daten über die Wirksamkeit verschiedener Temperaturen ist es möglich — wenn nötig —, die Aktivierungszeiten für die *Phycomyces*-Sporen noch weiter zu verkürzen.

In der folgenden Arbeit werden frühere Untersuchungen zur Frage der Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus* weitergeführt (Halbsguth und Rudolph 1959; Rudolph 1960a, 1960b), und darüber hinaus soll der Versuch unternommen werden, eine Arbeitshypothese zu formulieren, die es dann in Zukunft weiter zu prüfen gilt.

A. Methodik

Wie bisher wurde zu den Versuchen das Sporenmaterial von *Phycomyces blakesleeanus* Stamm 1+[2] benutzt. Die Sporen stammen von 11 ± 1 Tage alten Dunkelkulturen; Anzuchtstemperatur: 18 ± 1^0 C; Anzuchtssubstrat Vollkornbrot; Sterilisation zweimal im Abstand von 24 Std (zu technischen Einzelfragen vgl. Rudolph 1958). Als Substrat diente stets unsterilisierte Standard-Nährlösung: Glucose 15 g[3]; Asparagin 1 g; KH_2PO_4 m/100; $MgSO_4 + 7\ H_2O$ m/1000; $Ca(NO_3)_2 + 4\ H_2O$ m/2000; $FeCl_3 + 6\ H_2O$ m/10000; Vitamin B_1 1/100 γ/ml; Aqua bidest. (Quarz) ad 1000 ml; p_H $4{,}15 \pm 0{,}05$. Bei Zusatz der Inhibitoren wurde — falls die Pufferkapazität der Nährlösung nicht ausreicht —, um das p_H konstant zu halten, mit HCl bzw. KOH entsprechend dem p_H-Wert in Standard-Nährlösung eingestellt. p_H-Messungen Modell H 2 (Beckman), Elektrodenausrüstung 4880. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das beimpfte Substrat. Wärmevorbehandlung: 5 ml einer Suspension (Sporenmaterial zweimal gewaschen) wurde in einem Jenaer Reagensglas (160×16 mm; Fiolax-Glas) im Wasserbad bei 50 bzw. $54^0 \pm 0{,}05^0$ C unter kontinuierlichem Schütteln wärmevorbehandelt.

[1] Keimprozentsatz unvorbehandelter Sporen in nichtsterilisierter Standard-Nährlösung.

[2] Nummer des Stammes in der Sammlung von Halbsguth.

[3] Glucose der Fa. Schuchardt; alle übrigen Substanzen Fa. E. Merck (p. A. bzw. reinst).

Manometrische Messungen: (Warburg Modell V 85) nach UMBREIT, BURRIS und STAUFFER (1957); Vf 2,2 (0,2 ml KOH 5%ig, 1 ml Sporensuspension + 1 ml doppelt konzentrierte Nährlösung mit eventuellen Zusätzen). CO_2-Bestimmung nach direkter und indirekter Methode; Versuchstemperatur: 19,5° C, das Substrat wurde erst kurz vor Versuchsbeginn (s. Versuchsdaten) aus den beiden Ansatzbirnen zugekippt. Die Sporengewichtsbestimmung erfolgte über die Sporenzahl unter Benutzung der Beziehung 10^6 Sporen = 0,6 mg. Auswertung der Keimversuche mittels einer Zählkammer nach NEUBAUER; 5 ml Substrat in 100 ml Erlenmeyer-Kolben; Bebrütungstemperatur: 19—20° C.

Zur Acetaldehydbestimmung in der Nährlösung wurden die Sporen nach der Wärmevorbehandlung rasch abzentrifugiert, mit Nährlösung (einschließlich eventueller Zusätze) aufgenommen und 6 ml dieser Suspension in das Kulturrohr[1] pipettiert (zur Apparatur vgl. RUDOLPH 1960b) und sofort mit der Durchströmung[2] begonnen. (Die Strömungsgeschwindigkeit wurde gegenüber früher auf 2 l/min erhöht.) Der durch den Luftstrom mitgeführte Acetaldehyd wurde in einer eisgekühlten, 2%igen Bisulfitvorlage (4 ml) abgefangen und colorimetrisch nach STOTZ (1943) bestimmt. Nach einer gewissen Durchlaufzeit wurde dann die Bisulfitvorlage samt dem Absorptionsrohr rasch erneuert und der Extinktionskoeffizient gegen eine entsprechend behandelte Bisulfitvorlage einer gleichzeitig gelaufenen, unbeimpften Kontrolle gemessen. Bei Versuchen in N_2-Atmosphäre wurde Stickstoff (nach MEYER und RONGE 1939 nochmals gereinigt) durch das System gesaugt. Die Sporenmenge war je nach dem zu erwartenden Acetaldehyd verschieden gewählt; maximal 500 mg z. B. (RUDOLPH 1960b) bei unvorbehandelten Sporen, in der Regel aber 200—300 mg.

Zur Äthanolbestimmung enthält die Nährlösung kein $FeCl_3$ (p_H-Wert mit HCl auf 4,15 ± 0,05 eingestellt). Nach der Wärmevorbehandlung[3] wurde das Sporenmaterial rasch abzentrifugiert, mit H_2O aufgenommen auf ein Membranfilter gebracht, das Wasser rasch abgesaugt, ebenso einige ml Nährlösung, die im Anschluß daran zugegeben wurden. Danach wurde das Filter in drei bzw. vier Teile zerschnitten und die darauf befindlichen Sporen mit 2 ml Nährlösung in ein Zentrifugenglas gespült, die so angesetzten Proben auf einer Schüttelmaschine bei 20° C während der Versuchsdauer stark geschüttelt und mit Luft durchströmt. Nach anschließendem Zentrifugieren der Sporen konnte in der abdekantierten und filtrierten Nährlösung das Äthanol gemessen werden. Als Versuchsbeginn gilt der Zeitpunkt, zu dem auf dem Membranfilter die Nährlösung durchgesaugt ist. Denn es darf angenommen werden, daß bei Abspülen der Sporen mit 2 ml Nährlösung das in der Zwischenzeit (die im übrigen so kurz wie möglich gehalten wurde) auf dem Membranfilter ausgeschiedene Äthanol miterfaßt wird.

Bei Versuchen unter anaeroben Bedingungen wurde in vorwiegender N_2-Atmosphäre[4] N_2-durchströmte Nährlösung als letztes durch das Membranfilter gesaugt (die zerschnittenen Filterteile für die kurze Zwischenzeit in N_2-Atmosphäre aufbewahrt) und die Sporen mit Nährlösung, die durch Evakuieren und Begasen mit N_2 sauerstoff-frei gemacht worden war, in die Zentrifugengläser abgespült und anschließend auf der Schüttelmaschine das Versuchsmaterial durch einen doppelt durchbohrten Stopfen laufend mit gereinigtem N_2 durchströmt. Die Sporenmengen

[1] Seine Temperatur von 21,5° C wird durch ein Wasserbad konstant gehalten.

[2] Die Luft wurde durch das System nach Passieren einer mit destilliertem Wasser gefüllten Waschflasche (Fritte G_2) durchgesaugt.

[3] Die Suspension wurde wegen der großen Sporenmengen zur Wärmevorbehandlung auf drei bis vier Reagensgläser (je 5 ml) verteilt.

[4] Plastikglocke.

für die einzelnen Bestimmungen waren je nach dem zu erwartenden Äthanol verschieden gewählt, in der Regel etwa 200—300 mg. Die Bestimmungen wurden nach der ADH-Methode (BÜCHER und REDETZKI 1951, vgl. auch die Arbeitsanleitung der Fa. C. F. Boehringer) im Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin durchgeführt[1]. Die bei der Blutalkoholbestimmung notwendige Perchlorsäurefällung kann dabei unterbleiben. Bestimmungsansatz: 4,8 ml Pufferlösung; 0,1 ml DPN-Lösung; 0,1 bzw. 0,2 ml zu prüfende Nährlösung; 0,02 ml ADH-Suspension.

B. Untersuchungen

1. Versuche zum Gaswechsel, zur Acetaldehyd- und Äthanolproduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Die Beobachtung, daß nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° bzw. 54° C Sporen Acetaldehyd in die Nährlösung ausscheiden (RUDOLPH 1960b), während unvorbehandelte Sporen — in Nährlösung eingebracht — dies nicht vermögen, wurde weiter verfolgt. Die Acetaldehydproduktion nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 54° C ist unabhängig von der Anwesenheit der Nährlösung; wärmevorbehandelte Sporen entwickeln etwa die gleiche Menge Acetaldehyd unabhängig davon, ob sie in Nährlösung oder Wasser suspendiert sind (Abb. 1c, d). Das bedeutet aber nun, daß die angegebenen Acetaldehydwerte nicht der tatsächlich produzierten Menge entsprechen können, da der Anteil des Aldehyds, der während der Wärmevorbehandlung und dem anschließenden Zentrifugieren ausgeschieden wird, somit nicht erfaßt ist. Steigert man die Vorbehandlungstemperatur bei konstanter Vorbehandlungsdauer (3 min), so steigt auch die Menge des gebildeten Acetaldehyds an. Außerdem klingt die Acetaldehydproduktion weniger rasch ab. Die Werte für die Wärmevorbehandlung von 3 min 60° C sind in Abb. 1b dargestellt. Erst bei Vorbehandlungstemperaturen von 70° C und höher (3 min Vorbehandlungsdauer) läßt sich kein Acetaldehyd im Substrat mehr nachweisen. Dies ist um so bemerkenswerter, da nach einer Vorbehandlung von 3 min 60° C keine Sporen mehr keimen (SOMMER und HALBSGUTH 1957; RUDOLPH 1960b).

Wenn Acetaldehyd bei einem RQ-Wert >1 auftritt, liegt die Vermutung nahe, daß er auch als Wasserstoffacceptor dienen kann und es zur Bildung von Äthanol kommt. Mit der ADH-Methode wurde in mehreren Versuchen der Alkohol bestimmt, den die wärmevorbehandelten Sporen (3 min bei 50° bzw. 54° C) in die Nährlösung ausscheiden (Mittelwerte aus mehreren Versuchen, s. Abb. 1). Verglichen mit der relativ geringen Ausscheidung von Acetaldehyd ins Substrat nach einer

[1] An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. W. HALLERMANN herzlich für sein Entgegenkommen danken; Herr Dr. STEIGLEDER hat freundlicherweise im Blutalkohollabor die Äthanolbestimmungen überwacht.

Vorbehandlung von 3 min bei 50° C (Abb. 1f) ist anfangs die Äthanolproduktion dagegen (Abb. 1e) erheblich intensiver, läßt dann aber alsbald nach. Bei der Vorbehandlungstemperatur von 54° C nimmt die etwas verzögert einsetzende Äthanolausscheidung ein erheblich größeres

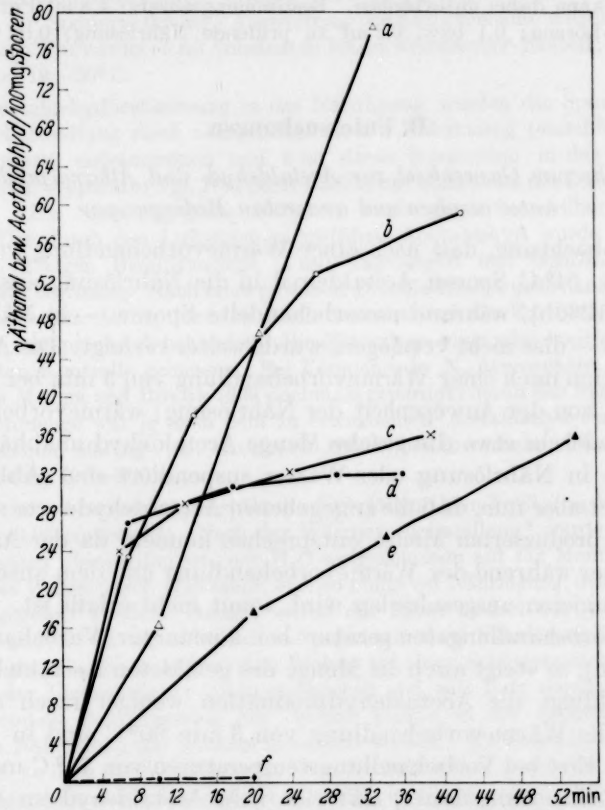


Abb. 1. *a*—*f* Äthanol- und Acetaldehydausscheidung im Anschluß an die Wärmevorbehandlung. *a* Äthanolausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *b* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 60° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *c* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen, in destilliertem Wasser; *d* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung (Versuch 50 f_4); *e* Äthanolausscheidung 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *f* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung (Versuch 50 h_1). Versuchsbeginn 6 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung

Ausmaß an (Abb. 1a). Bei unvorbehandelten Sporen läßt sich kein Äthanol in der Nährlösung nachweisen.

Über den Ausstoß von Extra-CO_2 als Folge einer Wärmevorbehandlung wurde bereits von mir berichtet. Nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° C klingt die Extra-CO_2-Bildung relativ rasch wieder ab (Abb. 1, RUDOLPH 1960a). Aus dem dort dargestellten Versuch ist die

Extra-CO_2-Menge errechnet und hier unter anderem in Abb. 2b aufgetragen. Nach einer Vorbehandlung von 3 min 54° C sind die RQ-Werte erhöht (RUDOLPH 1960b), da die O_2-Aufnahme bei dieser Vorbehandlungstemperatur bereits um etwa 28% (verglichen mit der Vorbehandlung bei 50° C) niedriger ist, während die CO_2-Entwicklung weniger stark herabgesetzt wird; der Extra-CO_2-Ausstoß hält aber auch länger an. (Die

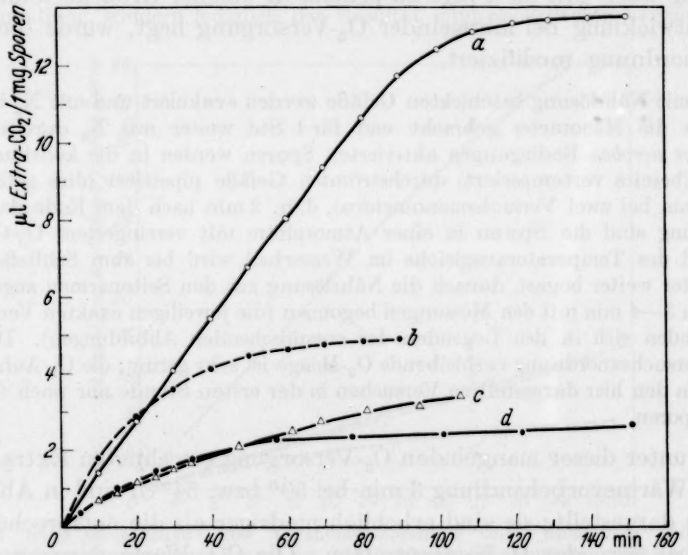


Abb. 2. *a*—*d* Extra-CO_2-Ausscheidung wärmevorbehandelter Sporen bei normaler und stark verringerter O_2-Konzentration, Substrat Standard-Nährlösung. *a* Extra-CO_2-Ausscheidung nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min 54° C, normale O_2-Versorgung; *b* Extra-CO_2-Ausscheidung nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min 50° C, normale O_2-Versorgung; *c* Extra-CO_2-Ausscheidung nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min 54° C, mangelnde O_2-Versorgung; *d* Extra-CO_2-Ausscheidung nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min 50° C, mangelnde O_2-Versorgung; *a* u. *b* Substratzusatz 8 min, Versuchsbeginn 10 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung; *c* u. *d* Substratzusatz 6 min, Versuchsbeginn 10 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung

nach einer Vorbehandlung von 3 min bei 54° C ausgeschiedene Extra-CO_2-Menge ist ebenfalls in Abb. 2a dargestellt.) Die absolute Menge an Extra-CO_2 läßt sich somit durch Erhöhung der Vorbehandlungstemperatur (54° C) steigern. Nach einer Wärmevorbehandlung scheiden Sporen auch unter anaeroben Bedingungen gegenüber unvorbehandeltem Sporenmaterial verstärkt CO_2 aus (RUDOLPH 1960a). Will man die dort unter völlig anaeroben Bedingungen gemessenen CO_2-Werte mit den hier erwähnten Extra-CO_2-Werten unter aeroben Bedingungen vergleichen, dann ergibt sich eine Schwierigkeit. Um die Zeit zwischen Ende der Aktivierung und Versuchsbeginn möglichst kurz zu halten und um dennoch eine völlige O_2-Abwesenheit zu erreichen, wurde die dort beschriebene Versuchsanordnung benutzt; dabei liegen aber zwischen dem

Ende der Aktivierung und Versuchsbeginn 17 min. Da aber gerade in den ersten Minuten nach der Vorbehandlung die Extra-CO_2-Bildung besonders stark einsetzt, kann ein (bezogen auf das Ende der Aktivierung) zeitlich verschiedener Versuchsbeginn bei zu vergleichenden Experimenten ein falsches Bild liefern. Ungeklärt war auch noch die Frage, ob die Evakuierung des Sporenmaterials nicht ohne Folgen auf die CO_2-Entwicklung war. Um die Frage zu prüfen, in welcher Größenordnung die CO_2-Entwicklung bei mangelnder O_2-Versorgung liegt, wurde die Versuchsanordnung modifiziert.

Die mit Nährlösung beschickten Gefäße werden evakuiert und mit N_2 begast, dann an die Manometer gebracht und für 1 Std weiter mit N_2 durchströmt. Die unter *aeroben* Bedingungen aktivierten Sporen werden in die kontinuierlich mit N_2 (bereits vortemperiert) durchströmten Gefäße pipettiert (dies gelingt in etwa 2 min bei zwei Versuchsmanometern), d. h. 2 min nach dem Ende der Vorbehandlung sind die Sporen in einer Atmosphäre mit verringertem O_2-Gehalt. Während des Temperaturausgleichs im Wasserbad wird bis zum Schließen der Manometer weiter begast, danach die Nährlösung aus den Seitenarmen zugekippt und nach 3—4 min mit den Messungen begonnen (die jeweiligen exakten Versuchsdaten finden sich in den Legenden der entsprechenden Abbildungen). Die bei dieser Versuchsanordnung verbleibende O_2-Menge ist sehr gering; die O_2-Aufnahme beträgt in den hier dargestellten Versuchen in der ersten Stunde nur noch 0,12 μl O_2/mg Sporen.

Die unter dieser mangelnden O_2-Versorgung errechneten Extra-CO_2-Werte (Wärmevorbehandlung 3 min bei 50° bzw. 54° C) sind in Abb. 2d bzw. 2c dargestellt; sie sind erheblich niedriger als die entsprechenden Werte bei normaler O_2-Konzentration. Die CO_2-Werte dagegen (Vorbehandlungstemperatur 50° C) unter völlig anaeroben Bedingungen liegen nur noch unwesentlich niedriger (RUDOLPH 1960a), wenn man den unterschiedlichen Versuchsbeginn (10 bzw. 17 min nach der Vorbehandlung) berücksichtigt.

Infolge der stark herabgesetzten CO_2-Entwicklung bei mangelnder O_2-Versorgung war es wichtig, die unter entsprechenden Bedingungen produzierten Äthanol- und Acetaldehydmengen zu kennen. Die gemessenen Werte sind in Abb. 3 dargestellt. Sowohl nach einer Vorbehandlung bei 50° C (3d) als auch bei 54° C (3b) sind die ausgeschiedenen Äthanolmengen erheblich geringer als unter aeroben Versuchsbedingungen (Abb. 1e, 1a), während die anaerob entwickelten Acetaldehydmengen (Abb. 3c, 3a) größer sind. Die Summe von ausgeschiedenem Äthanol + Acetaldehyd ist unter anaeroben Bedingungen — unabhängig von der Vorbehandlungstemperatur — aber stets geringer als unter aeroben Versuchsbedingungen. Darüber hinaus deutet das rasche Abklingen der CO_2-, Acetaldehyd- und Äthanolausscheidung darauf hin, daß wärmevorbehandelte Sporen unter anaeroben Bedingungen nicht in der Lage sind, im wesentlichen Ausmaß zu gären.

Das Resultat, daß nach Wärmevorbehandlung unter anaeroben Versuchsbedingungen die Summe der Gärungsprodukte Acetaldehyd und Äthanol gegenüber aeroben Bedingungen vermindert ist, wird bedeutsam, wenn man die Versuchsanordnung, die bei der Äthanolbestimmung beschrieben ist, kritisch betrachtet. Es könnte der Einwand gemacht werden, daß den Sporen (200—300 mg), die mit 2 ml Nährlösung aufgenommen, trotz kontinuierlichem, intensivem Schütteln nicht genügend Sauerstoff zur Verfügung steht und sie so „gezwungenermaßen" gären, daß die Äthanolbildung damit nicht die Folge der vorausgegangenen Wärmevorbehandlung, sondern lediglich das Resultat unphysiologischer Versuchsbedin-

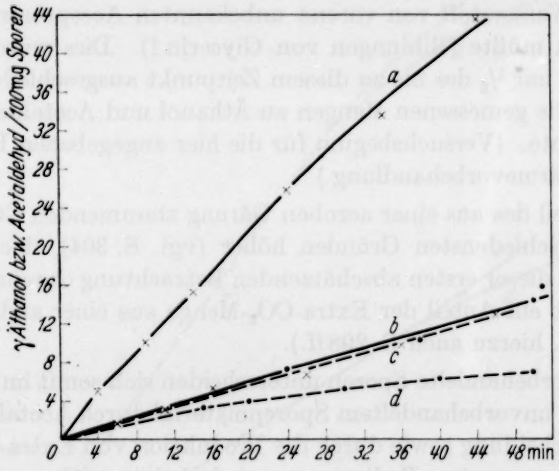


Abb. 3. *a—d* Acetaldehyd- und Äthanolausscheidung unter anaeroben Bedingungen. *a* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *b* Äthanolausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *c* Acetaldehydausscheidung 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung; *d* Äthanolausscheidung 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung. Versuchsbeginn 6 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung

gungen sei. Da aber bei O_2-Mangel — wie beschrieben — Äthanol in geringem Maße auftritt, könnten höchstenfalls die Äthanolwerte zu niedrig sein. Bei starker Variation der Sporenmenge — unter sonst gleichen Bedingungen — stimmen die Werte nach Umrechnung auf z. B. 100 mg Sporen befriedigend überein. Etwaige Bedenken, daß der beschriebene Acetaldehydausstoß z. B. Vorbehandlung 3 min 54° C die Folge einer ungenügenden O_2-Versorgung sei, werden durch den Vergleich der Kurven Abb. 1d und Abb. 3a beseitigt; wenn auch die Acetaldehydausscheidung unter anaeroben Bedingungen länger anhält und damit letztlich höhere Gesamtwerte erzielt werden, so ist doch der zeitliche Verlauf völlig verschieden. Dem anfangs sehr intensiven, dann aber sehr rasch abklingenden Acetaldehydausstoß unter aeroben Bedingungen steht unter anaeroben Bedingungen eine länger andauernde, weniger stürmische Entwicklung gegenüber. Damit kommen die Anfangswerte unter aeroben Bedingungen höher zu liegen als unter anaeroben, womit dann erwiesen ist, daß der beschriebene Acetaldehydausstoß im Anschluß an die Wärmevorbehandlung nicht die Folge mangelnder O_2-Versorgung sein kann. Auch hier führt die Variation der Sporenmenge bei sonst gleichen Versuchsbedingungen nach Umrechnung auf 100 mg Sporen zu Werten, die befriedigend übereinstimmen.

Wenn man — für eine orientierende Überschlagsrechnung — einmal die Annahme macht, daß das im Anschluß an eine Wärmevorbehandlung ausgeschiedene Äthanol aus einer Gärung nach dem Embden-Meyerhof-Schema stammt, dann lassen sich nach einer Wärmevorbehandlung bei 54° C nach 30 min im Mittel etwa 182×10^{-9} Mole Extra-CO_2[1] errechnen, in der gleichen Zeit aber nur $15{,}3 \times 10^{-9}$ Mole Äthanol[2]; es sollen weiterhin die unter den entsprechenden Bedingungen ausgeschiedenen $7{,}3 \times 10^{-9}$ Mole Acetaldehyd[2] auf dem gleichen Wege entstanden sein, wobei der Wasserstoff von vorerst unbekannten Acceptoren aufgenommen werden müßte (Bildungen von Glycerin?). Dies würde dann bedeuten, daß nur $^1/_8$ des bis zu diesem Zeitpunkt ausgeschiedenen Extra-CO_2 durch die gemessenen Mengen an Äthanol und Acetaldehyd erklärt werden könnte. (Versuchsbeginn für die hier angegebenen Daten 6 min nach der Wärmevorbehandlung.)

Der Anteil des aus einer aeroben Gärung stammenden CO_2 ist sicher aus den verschiedensten Gründen höher (vgl. S. 304), doch verbleibt vorerst nach dieser ersten abschätzenden Betrachtung durchaus der Eindruck, als ob ein Anteil der Extra-CO_2-Menge aus einer anderen Quelle stammt (vgl. hierzu auch S. 298ff.).

Wärmevorbehandelte Sporen unterscheiden sich somit im aktivierten Zustand von unvorbehandeltem Sporenmaterial durch Acetaldehyd- und Äthanolausscheidung sowie durch die Produktion von Extra-CO_2. Beim Übergang zu anaeroben Bedingungen sind aktivierte Sporen aber nicht in der Lage, auf ein gut funktionierendes Gärungssystem umzuschalten.

2. Versuche mit Jodessigsäure

In der auf S. 302ff. zu entwickelnden Arbeitshypothese soll versucht werden, die Ausscheidung von Äthanol und Acetaldehyd im Anschluß an eine Wärmevorbehandlung als Folge eines im Verhältnis zum oxydativen Endabbau zu stark stimulierten, einleitenden Glucoseabbaus zu deuten. Ein Inhibitor, der den einleitenden Glucoseabbau zu drosseln vermag, müßte demnach die Ausscheidung von Acetaldehyd und Äthanol herabsetzen können. Phosphoglycerinaldehyd-dehydrogenase wird im allgemeinen als das empfindlichste Ferment gegenüber Jodessigsäure betrachtet. Allderdings werden auch — zumal bei höheren Inhibitorkonzentrationen — andere SH-Gruppen-Fermente gehemmt (zusammenfassende Darstellung vgl. JAMES 1953; HACKETT 1960). Eine teilweise Inaktivierung der Phosphoglycerinaldehyd-dehydrogenase müßte somit eine Herabsetzung des einleitenden Glucoseabbaus zur Folge haben.

[1] Die Einzelwerte schwanken relativ stark!

[2] Werte gut reproduzierbar!

Jodessigsäure wirkt in sehr geringen Konzentrationen äußerst stark keimungshemmend auf wärmevorbehandelte Sporen. Enthält eine Nährlösung den Inhibitor in den Konzentrationen 538×10^{-4} und 538×10^{-5} molar (p_H-Wert mit KOH eingestellt), so haben 3 min bei 50° C wärmevorbehandelte Sporen nach 14stündiger Bebrütungszeit (19° C) noch keine Vacuolen ausgebildet; 538×10^{-6} molar Jodessigsäure in der Nähr-

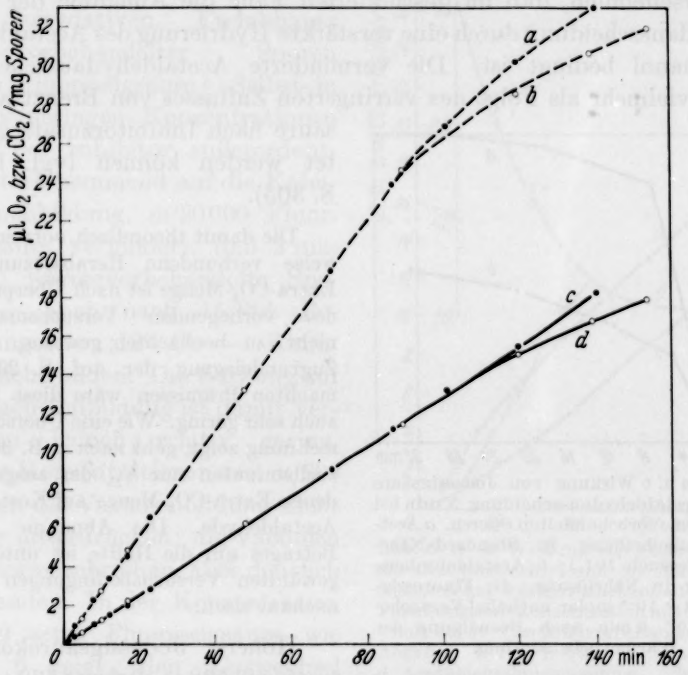


Abb. 4. *a*—*d* Wirkung von Jodessigsäure auf den Gaswechsel 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen; Jodessigsäurekonzentration 269×10^{-6} molar. *a* CO_2-Abgabe in Standard-Nährlösung; *b* CO_2-Abgabe bei Fluoressigsäurezusatz; *c* O_2-Aufnahme in Standard-Nährlösung; *d* O_2-Aufnahme bei Fluoressigsäurezusatz. Substratzusatz 6 min, Versuchsbeginn „0" 10 min nach beendeter Wärmevorbehandlung

lösung unterbindet jegliche Keimschlauchbildung, und die entstandenen Vacuolen sind sehr klein. Nach einer Bebrütung von 14 Std in Nährlösung mit Jodessigsäure 538×10^{-7} molar haben praktisch alle Sporen Vacuolen, aber erst etwa 70% Keimschläuche gebildet, während sich in der Kontrolle zu dieser Zeit schon Mycel zu entwickeln beginnt.

Der Gaswechsel wird je nach der Jodessigsäurekonzentration verschieden beeinflußt. Abb. 4 zeigt die Wirkung des Inhibitors in der Konzentration 269×10^{-6} molar (Sporen 3 min bei 54° C wärmevorbehandelt). Gegenüber der Kontrolle ist anfangs keine Abweichung festzustellen, im Anschluß daran wird der Gaswechsel aber deutlich herabgesetzt. In dieser ersten Phase (etwa 80—90 Versuchsminuten), in der

der Gaswechsel nicht merklich verändert ist, setzt aber Jodessigsäure in der gleichen Konzentration die Acetaldehydausscheidung erheblich herab (vgl. Abb. 5b).

Die Bestimmung des ausgeschiedenen Äthanols mit ADH-Methode mußte wegen der Empfindlichkeit der Äthanol-dehydrogenase gegenüber Jodessigsäure unterbleiben; aus dem gleichen Grunde ist es auch höchst unwahrscheinlich, daß im geschilderten Falle die Abnahme der Acetaldehydausscheidung durch eine verstärkte Hydrierung des Acetaldehyds zu Äthanol bedingt ist. Die verminderte Acetaldehydausscheidung dürfte vielmehr als Folge des verringerten Zuflusses von Brenztraubensäure nach Inhibitorzusatz gedeutet werden können (vgl. hierzu S. 305).

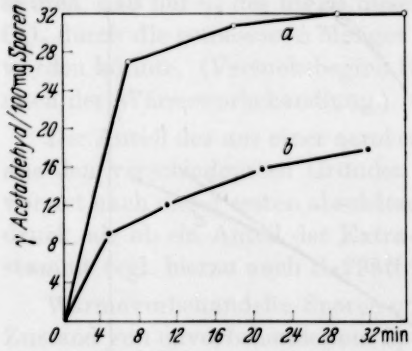


Abb. 5. *a* u. *b* Wirkung von Jodessigsäure auf die Acetaldehydausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelten Sporen. *a* Acetaldehydausscheidung in Standard-Nährlösung (Versuch 50 f_4); *b* Acetaldehydausscheidung in Nährlösung, die Fluoressigsäure 269×10^{-6} molar enthält. Versuchsbeginn „0" 6 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung

Die damit theoretisch notwendigerweise verbundene Herabsetzung der Extra-CO_2-Menge ist nach Überprüfung des vorliegenden Versuchsmaterials nicht zu beobachten gewesen. Unter Zugrundelegung der auf S. 292 gemachten Prämissen wäre diese Menge auch sehr gering. Wie eine Überschlagsrechnung zeigt, geht nach z. B. 30 Versuchsminuten nur $^1/_{25}$ der ausgeschiedenen Extra-CO_2-Menge auf Kosten des Acetaldehyds. Die Abnahme dieses Betrages um die Hälfte ist unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen.

Höhere Jodessigsäurekonzentrationen 538×10^{-6} und 538×10^{-5} molar setzen zwar die O_2-Aufnahme zu einem erheblich früheren Zeitpunkt herab (die CO_2-Abgabe allerdings weniger stark, RQ-Erhöhung!), doch vermögen sie nicht die Acetaldehydausscheidung noch weiter zu vermindern. Dies wird möglicherweise durch die zusätzliche Hemmung einer Reihe weiterer dehydrierender Systeme wie z. B. der Äthanol-dehydrogenase (z. B. STILL 1940; BARRON 1951; HOLZER et al. 1955) und eventuell auch oxydativer Stufen im Rahmen des Endabbaues (YANG 1957) bewirkt; denn falls erheblich weniger Brenztraubensäure nach Jodessigsäurezugabe in größeren Konzentrationen in den oxydativen Endabbau abfließt bzw. die Bildung von Äthanol weitgehend blockiert wird, braucht die Acetaldehydausscheidung trotz bereits gedrosselten Brenztraubensäurezuflusses nicht noch geringer werden.

Jodessigsäure ist der einzige der hier geprüften Inhibitoren, der die Acetaldehydproduktion vermindert.

3. Versuche mit Fluoressigsäure

Mit Fluoressigsäure hat man die Möglichkeit, den Tricarbonsäure-Cyclus in einer sehr frühen Stufe zu blockieren. Das Fluoracetat verhält sich ähnlich wie das Acetat im Stoffwechsel. So kommt es zur Synthese von Fluorcitronensäure, die dann aber den weiteren Abbau durch die Aconitase blockiert (zusammenfassende Darstellung s. PETERS 1957).

Wie äußert sich eine Hemmung des oxydativen Endabbaues wärmevorbehandelter Sporen durch Fluoressigsäure? Selbst in relativ geringen Konzentrationen wirkt der Inhibitor außerordentlich stark hemmend auf die Keimschlauchbildung. m/20000 Fluoressigsäure verhindert, daß 3 min 50° C wärmevorbehandelte Sporen — auch nach 15 Std Bebrütungszeit (18° C) — Keimschläuche bilden. Die Wirkung auf die Vacuolenbildung ist damit verglichen jedoch relativ gering. Selbst Konzentrationen von m/500 können die Vacuolenbildung nicht völlig unterdrücken; die Vacuolen sind zwar sehr klein, aber deutlich vorhanden. In der Konzentration m/100 setzt Fluoressigsäure, wie Abb. 6 zeigt, den Gaswechsel 3 min wärmevorbehandelter Sporen herab (mittlerer Qo_2-Wert in Standard-Nährlösung = 11,39; RUDOLPH 1960a). Außerdem erfolgt die O_2-Aufnahme anfangs (Intervall 0—100 min) nicht mit konstanter Rate wie in Standard-Nährlösung; erst nach 100 min wird die Hemmung konstant ($Qo_2 = 5{,}7$), und der starke Anstieg der O_2-Aufnahme, wie er in Standard-Nährlösung nach etwa 100—120 min einsetzt (HALBSGUTH und RUDOLPH 1959), bleibt aus. Da die O_2-Aufnahme zu Beginn stärker blockiert wird als die CO_2-Abgabe, kommt es zu erhöhten RQ-Werten, die aber innerhalb kurzer Zeit stark abfallen und ab 40 min wieder denen in Standard-Nährlösung entsprechen (RUDOLPH 1960b, Abb. 2). Dem absoluten Betrag nach ist die Extra-CO_2-Ausscheidung aber nicht wesentlich verändert, die Acetaldehydausscheidung in die Nährlösung nach Fluoressigsäurezugabe jedoch gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 6d).

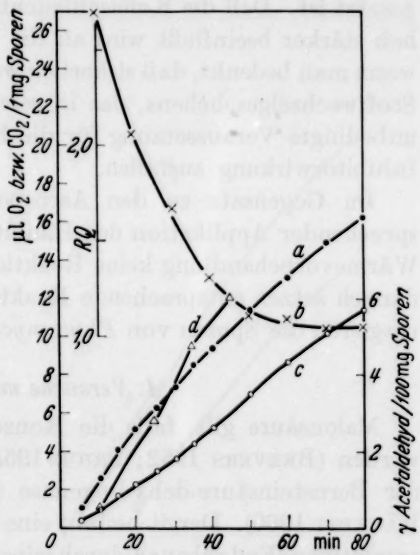


Abb. 6. *a—d* Wirkung von Fluoressigsäure auf den Gaswechsel und die Acetaldehydausscheidung wärmevorbehandelter Sporen. Fluoressigsäurekonzentration m/100, Sporen 3 min bei 50° C wärmevorbehandelt. *a* CO_2-Abgabe; *b* RQ-Werte; *c* O_2-Aufnahme; *d* Acetaldehydausscheidung. Substratzusatz 7 min, Versuchsbeginn „0" 10 min nach beendeter Wärmevorbehandlung

Dieses Resultat deutet darauf hin — die Spezifität des Inhibitors vorausgesetzt —, daß der Citronensäure-Cyclus im Stoffwechselgeschehen im Anschluß an die Wärmeaktivierung eine wesentliche Rolle spielt. Die vermehrte Ausscheidung von Acetaldehyd[1] wäre dann Folge der verstärkten Decarboxylierung von Brenztraubensäure, da die Möglichkeit ihres oxydativen Abbaus infolge der Blockierung der Aconitase herabgesetzt ist. Daß die Keimschlauchbildung durch Fluoressigsäure erheblich stärker beeinflußt wird als die Vacuolenbildung, wird verständlich, wenn man bedenkt, daß sicherlich wesentliche Teile eines sehr komplexen Stoffwechselgeschehens, das in seiner vollfunktionierenden Gesamtheit unbedingte Voraussetzung für die Keimschlauchbildung ist, infolge der Inhibitorwirkung ausfallen.

Im Gegensatz zu den Ascosporen von *Neurospora*, die bei entsprechender Applikation des Inhibitors in den ersten 110 min nach der Wärmevorbehandlung keine Reaktion auf Fluoressigsäure zeigen — erst danach setzen entsprechende Reaktionen ein (SUSSMAN et al. 1956) —, reagieren die Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* sofort.

4. Versuche mit Malonsäure

Malonsäure gilt, falls die Konzentrationen nicht zu hoch gewählt werden (BEEVERS 1952; PRICE 1953), als relativ spezifischer Inhibitor der Bernsteinsäure-dehydrogenase (Literaturübersicht s. JAMES 1953; HACKETT 1960). Damit besteht eine weitere Möglichkeit, im Rahmen des oxydativen Endabbaues durch einen Inhibitor hemmend einzugreifen. Wie wirkt sich die Zugabe von Malonsäure auf das Stoffwechselgeschehen wärmevorbehandelter Sporen aus?

Enthält die Nährlösung Malonsäure, so wird im Konzentrationsbereich 10^{-2}—10^{-3} molar (p_H-Wert eingestellt mit KOH) die Vacuolen- und Keimschlauchbildung nicht gestört (ausgezählt nach 12 Std). Malonsäure 0,1 molar beeinflußt den Keimungsvorgang dergestalt, daß die Vacuolen kleiner sind und die Keimschläuche — soweit sie gebildet werden — relativ kurz bleiben. Gaswechseluntersuchungen bestätigen dieses Bild. Der Zusatz von Malonsäure 0,1 molar hemmt die O_2-Aufnahme beträchtlich. Niedrigere Konzentrationen haben aber nur eine relativ geringe Wirkung. So ist z. B. bei Zusatz von Malonsäure m/100 außer dem in Abb. 7 dargestellten Effekt während der ersten 60 Versuchsminuten gegenüber Standard-Nährlösung sonst keine Abweichung festzustellen. Die O_2-Aufnahme wird anfangs herabgesetzt und zwar stärker als die CO_2-Abgabe; aber schon nach 60 Versuchsminuten entspricht das

[1] Die Äthanolwerte stehen noch aus, doch besteht vorerst kein Grund zur Annahme, daß die verstärkte Acetaldehydausscheidung die Folge einer verminderten Äthanolbildung ist; Entsprechendes gilt auch für die Versuche mit Malonsäure (s. S. 296f.).

Gaswechselverhalten wieder dem in Standard-Nährlösung. Dadurch, daß zu Beginn die O_2-Aufnahme stärker gehemmt wird als die CO_2-Abgabe, kommt es zu einer verstärkten Extra-CO_2-Bildung und zu erhöhten RQ-Werten, welche allerdings rasch abfallen und nach 60 min wieder den Werten in Standard-Nährlösung entsprechen. In der gleichen Konzentration wirkt der Inhibitor außerdem fördernd auf die Acetaldehydausscheidung, die nach 20 min verglichen mit der Kontrolle 6—7mal intensiver ist. Während die Wirkung von Malonsäure auf den gesamten Keimungsvorgang somit in dieser Konzentration relativ gering ist, wird doch die Beeinflussung des Stoffwechselgeschehens in den ersten 60 Versuchsminuten völlig offensichtlich. Höhere Konzentrationen (m/10 z. B.) beeinflussen das Stoffwechselgeschehen zwar stärker und anhaltender, doch besteht dabei die Gefahr, daß nicht nur die Bernsteinsäure-Dehydrogenase gehemmt wird.

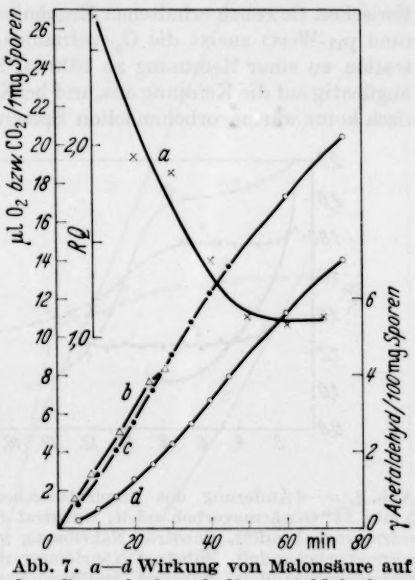


Abb. 7. *a*—*d* Wirkung von Malonsäure auf den Gaswechsel und die Acetaldehydausscheidung wärmevorbehandelter Sporen. Malonsäurekonzentration m/100, Sporen 3 min bei 50° C wärmevorbehandelt. *a* RQ-Werte; *b* ausgeschiedene Acetaldehydmenge; *c* CO_2-Abgabe; *d* O_2-Aufnahme. Substratzusatz 6 min, Versuchsbeginn „0" 8 min nach beendeter Wärmevorbehandlung

RQ-Erhöhungen infolge der verstärkten Hemmung der O_2-Aufnahme nach Malonsäurezugabe sind verschiedentlich beschrieben worden (z. B. LATIES 1949; HANLEY et al. 1952). An Maiswurzeln konnte BEEVERS (1952) nachweisen, daß im Zusammenhang mit den erhöhten RQ-Werten nach Malonsäurezugabe Alkohol und Acetaldehyd auftreten. Die verminderte Verarbeitung der Brenztraubensäure im Zuge des herabgesetzten oxydativen Endabbaus bedingt, daß Brenztraubensäure zu Acetaldehyd decarboxyliert wird und es damit zu einer aeroben Gärung kommt. Entsprechend ließen sich die hier mit Malonsäure erhaltenen Ergebnisse interpretieren. Der Rückgang der Malonathemmung bei der Konzentration m/100 könnte durch den Anstieg des Succinatspiegels bedingt sein, denn das Ausmaß der kompetitiven Hemmung hängt stark vom Konzentrationsverhältnis der beteiligten Partner ab (z. B. THORN 1953).

So deuten die Experimente mit Malonsäure — entsprechend denen mit Fluoressigsäure — darauf hin, daß das Auftreten von Gärungs-

produkten (Acetaldehyd, Äthanol?) im Anschluß an die Wärmeaktivierung durch eine Verminderung der Leistungsfähigkeit des Endabbaus verstärkt werden kann.

5. Versuche mit 2,4-Dinitrophenol[1]

In Übereinstimmung mit den an Mikroorganismen, höheren Pflanzen und tierischen Geweben erhaltenen Ergebnissen stimuliert DNP je nach Konzentration (und p_H-Wert) zuerst die O_2-Aufnahme, um dann bei weiter steigender Konzentration zu einer Hemmung zu führen; Konzentrationen $>10^{-5}$ molar wirken sich ungünstig auf die Keimung aus, und bei Konzentrationen $>10^{-4}$ molar keimen praktisch keine wärmevorbehandelten Sporen mehr. Der CO_2-Ausstoß unter anaeroben

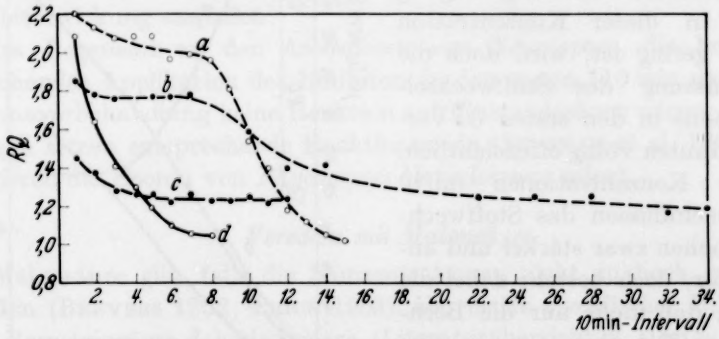


Abb. 8. *a—d* Änderung des Respiratorischen Quotienten nach DNP-Zusatz. *a* Sporen 3 min 54° C wärmevorbehandelt, Substrat Standard-Nährlösung; *b* Sporen 3 min 54° C wärmevorbehandelt, Substrat Nährlösung mit DNP 10^{-4} molar; *c* Sporen 3 min 50° C wärmevorbehandelt, Substrat Nährlösung mit DNP 10^{-4} molar; *d* Sporen 3 min 50° C wärmevorbehandelt, Substrat Standard-Nährlösung (RUDOLPH 1960b). Substratzusatz 8 min, Versuchsbeginn 10 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung

Bedingungen im Anschluß an eine Wärmevorbehandlung wird durch DNP 10^{-4} molar zuerst gehemmt, dann aber gefördert. Bei der Konzentration 5×10^{-5} molar ist die Hemmung geringer, die Förderung stärker. Die die O_2-Aufnahme maximal steigernde Konzentration ($1{,}25 \times 10^{-5}$ molar) hat praktisch keinen Einfluß auf die anaerobe CO_2-Entwicklung (RUDOLPH 1960b).

Die Konzentration 10^{-4} molar, die nahezu völlig die Keimung 3 min 50° C wärmevorbehandelter Sporen unterbindet und die O_2-Aufnahme zu einem Teil herabsetzt[2], wirkt nicht in gleichem Sinne auf die CO_2-Ausscheidung (vgl. Abb. 8d, c); wie an Hand der respiratorischen Quotienten zu sehen ist, wird die Extra-CO_2-Entwicklung zunächst gehemmt, dann klingt aber der CO_2-Ausstoß nicht so rasch wie in Standard-Nährlösung ab, und infolgedessen wird über längere Zeit ein erhöhter RQ aufrechterhalten. In gleicher Weise wirkt DNP-Zusatz auf Sporen, die 3 min bei 54° C wärmevorbehandelt wurden und infolgedessen einen erheblich länger anhaltenden Extra-CO_2-Ausstoß zeigen, Abb. 8a, b[2] (vgl. z. B.

[1] DNP.

[2] Die verminderte Rate der O_2-Aufnahme blieb im Versuchszeitraum konstant.

Kontrolle Abb. 4, S. 293). 3 min bei 50° C wärmevorbehandelte Sporen scheiden nach DNP-Zusatz (m/10000) in immer stärker werdendem Maße Acetaldehyd in das Substrat aus (Abb. 9c). Nach 6 min entsprechen die Acetaldehydmengen noch etwa denen in Standard-Nährlösung (Abb. 9e), dann aber setzt eine verstärkte Acetaldehydbildung ein. DNP m/20000 wirkt entsprechend nur schwächer (Abb. 9d). Bei 3 min 54° C wärmevorbehandelten Sporen wird die an sich schon erhöhte Acetaldehydausscheidung durch DNP-Zusatz (m/10000) noch erheblich verstärkt (Abb. 9a). Diese Versuchsanordnung liefert die größten Acetaldehydmengen, die im Zusammenhang der bisher durchgeführten Versuche gemessen wurden. Diese starke Acetaldehydquelle konnte daher im Rahmen der Untersuchungen zur Keimungsförderung von Acetaldehyd benutzt werden, um unvorbehandelte Sporen durch Acetaldehyd zur Keimung anzuregen (RUDOLPH 1961).

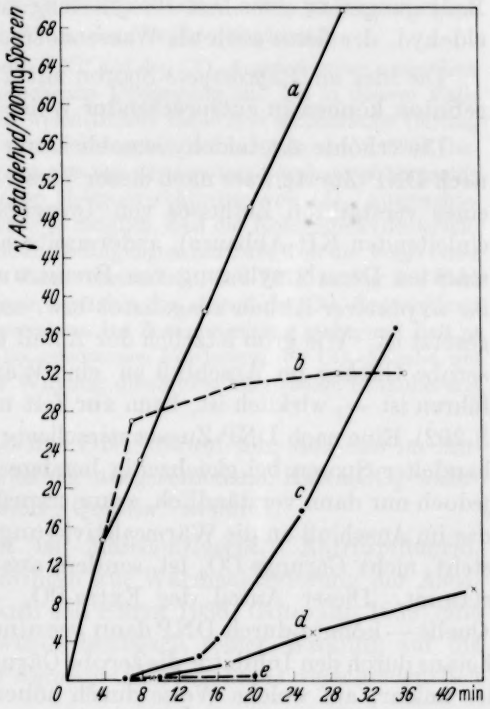


Abb. 9. *a*—*e* Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf die Acetaldehydausscheidung wärmevorbehandelter Sporen. *a* Acetaldehydausscheidung von 3 min 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Nährlösung enthält DNP 10^{-4} molar; *b* Acetaldehydausscheidung von 3 min 54° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung (Versuch $50f_4$); *c* Acetaldehydausscheidung von 3 min 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Nährlösung enthält DNP 10^{-4} molar; *d* Acetaldehydausscheidung von 3 min 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Nährlösung enthält DNP 5×10^{-5} molar; *e* Acetaldehydausscheidung von 3 min 50° C wärmevorbehandelten Sporen, Substrat Standard-Nährlösung (Versuch $50h_1$). Versuchsbeginn „0" 6 min nach Beendigung der Wärmevorbehandlung (DNP-Zusatz verändert in dieser geringen Konzentration den p_H-Wert der Nährlösung nicht)

Durch DNP wird vielfach eine aerobe Gärung induziert, zum Teil schon in einem Konzentrationsbereich, in dem die O_2-Aufnahme stimuliert wird bzw. wieder der Kontrolle entspricht, und oft in verstärktem Maße bei höheren DNP-Konzentrationen, die die O_2-Aufnahme herabsetzen. Diese Reaktionsweise kann im Zusammenhang mit der Wirkung von DNP auf die Atmungskettenphosphorylierung gedeutet werden. Die infolge der Entkopplung verminderte ATP-Synthese hat ein erhöhtes

Angebot an Orthophosphat und ADP zur Folge, welches dann stimulierend auf den einleitenden Glucoseabbau wirkt. Bei einem ausgelasteten bzw. schon gehemmten oxydativen Endabbau kommt es unter aeroben Bedingungen zu einer Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd, der dann auch als Wasserstoffacceptor dienen kann[1].

Die hier an *Phycomyces*-Sporen mit 2,4-Dinitrophenol erzielten Ergebnisse können in entsprechender Weise gedeutet werden.

Die erhöhte Acetaldehydausscheidung wärmevorbehandelter Sporen nach DNP-Zusatz wäre nach dieser Vorstellung dann einerseits die Folge eines verstärkten Zuflusses von Brenztraubensäure (Stimulierung des einleitenden KH-Abbaues), andererseits aber auch die Folge einer verstärkten Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd, da ihr oxydativer Abbau ausgelastet bzw. sogar bei DNP m/10000 herabgesetzt ist. Wie groß letztlich der Anteil des Extra-CO_2 — das auf eine aerobe Gärung im Anschluß an eine Wärmevorbehandlung zurückzuführen ist —, wirklich ist, kann zur Zeit nicht abgeschätzt werden (vgl. S. 292). Eine nach DNP-Zusatz stimulierte aerobe Gärung[2] wärmevorbehandelter Sporen bei gleichzeitig herabgesetzter Extra-CO_2-Menge wird jedoch nur dann verständlich, wenn ursprünglich ein Teil des Exta-CO_2, das im Anschluß an die Wärmeaktivierung in Standard-Nährlösung entsteht, nicht Gärungs-CO_2 ist, sondern aus anderen Decarboxylierungen stammt. Dieser Anteil des Extra-CO_2 — aus vorerst unbekannter Quelle — könnte durch DNP dann vermindert werden, während darüber hinaus durch den Inhibitor die aerobe Gärung noch stimuliert wird. Zwar ist unklar, auf welche Weise durch höhere DNP-Konzentrationen die Atmung herabgesetzt wird (SIMON 1953; LARDY 1956); im hier vorliegenden Falle müßte jedoch gefordert werden, daß die Decarboxylierungen, die den Anteil des Extra-CO_2 aus noch unbekannter Quelle

[1] Bezüglich der umfangreichen Literatur sei auf zusammenfassende Darstellungen wie z. B. SIMON (1953); BRODY (1955); LATIES (1957) verwiesen.

[2] Es besteht kein Grund zur Annahme, daß die verstärkte Acetaldehydausscheidung lediglich die Folge einer geringeren Äthanolbildung ist. (Die Äthanolbestimmung nach DNP-Vergiftung liegt noch nicht vor.) Sehr wahrscheinlich ist vielmehr der Fall, daß mit der Förderung der Acetaldehydausscheidung auch die Äthanolbildung ansteigt. Zwar wird sich diese Frage erst nach Kenntnis der fehlenden Daten endgültig entscheiden lassen, doch ist auf Grund der vorhandenen Acetaldehydwerte schon festzustellen, daß die erhöhten Aldehydwerte 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen nicht allein durch eine verminderte Äthanolbildung erklärt werden können. Nach 35 Versuchsminuten beträgt die nach DNP-Vergiftung (m/10000) ausgeschiedene Acetaldehydmenge 36,5 γ/100 mg Sporen. In Standard-Nährlösung scheidet entsprechend behandeltes Sporenmaterial aber nur 0,5 γ Acetaldehyd + 26 γ Äthanol/100 mg Sporen aus! So wird bei den folgenden Betrachtungen (vgl. S. 302ff.) die Annahme zugrunde gelegt, daß durch DNP — entsprechend der starken Acetaldehydförderung — auch die Äthanolausscheidung stark stimuliert wird.

liefern, durch DNP (in höheren Konzentrationen) stärker gehemmt werden als die O_2-Aufnahme.

Bei der DNP-Konzentration, die die O_2-Aufnahme maximal stimuliert (1,25 $\times 10^{-5}$ molar), ist verglichen mit der Kontrolle die Extra-CO_2-Bildung nur ganz geringfügig beeinflußt (geringe Hemmung, dann leichte Förderung).

Für die Deutung der Wirkung von DNP auf den CO_2-Ausstoß unter anaeroben Bedingungen bietet sich eine entsprechende Überlegung an. Da in diesem Falle wärmevorbehandelte Sporen nicht in wesentlichem Maße eine alkoholische Gärung durchzuführen vermögen, handelt es sich wahrscheinlich bei dem auf S. 290f. beschriebenen Phänomen vorwiegend um eine aus der aeroben Vorphase abklingende Erscheinung. Auf Grund der molaren Mengenverhältnisse von CO_2, ausgeschiedenem Äthanol und Acetaldehyd wäre es möglich, daß die Kohlendioxydentwicklung nach dem Übergang zu anaeroben Bedingungen nur zum Teil die Folge einer ausklingenden Gärung ist. Es wäre dann verständlich, daß DNP analog den Verhältnissen unter aeroben Bedingungen zunächst den Anteil der CO_2-Entwicklung herabsetzt, der nicht mit Gärungsprozessen im Zusammenhang steht, und daß es sich bei der gegenüber der Kontrolle gemessenen Förderung der CO_2-Abgabe um die Folge einer Überlagerung dieser Wirkung durch eine kurzfristige Stimulierung der abklingenden Gärung handelt.

So deuten die Experimente mit DNP darauf hin, daß das im Anschluß an die Wärmevorbehandlung ausgeschiedene Extra-CO_2 wahrscheinlich aus zwei verschiedenen „Quellen" stammt.

Bemerkungen zu Versuchen mit Natriumfluorid. Natriumfluorid, das im Rahmen der Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Ascosporen von *Neurospora* (Goddard und Smith 1938; Goddard 1939) eine zentrale Stellung einnimmt, wurde bezüglich seiner Wirkung auf die wärmeaktivierten Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* verschiedentlich geprüft (Rudolph 1960a, b).

Die Keimung wärmevorbehandelter Sporen wird zwar ebenfalls stark durch NaF gehemmt, wobei der p_H-Wert der Nährlösung eine große Rolle spielt; doch ist die Wirkung von NaF unspezifisch, und die beobachteten Reaktionen beruhen sicherlich nicht nur auf der Blockierung der Enolase. So wird z. B. die Veratmung von Brenztraubensäure und Ammoniumacetat in Ansätzen, die mit NaF m/100 vergiftet sind, völlig bzw. teilweise blockiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an *Neurospora*-Ascosporen (Goddard und Smith 1938; Goddard 1939) hemmt NaF nicht die CO_2-Entwicklung unter anaeroben Bedingungen, sondern nach Fluoridzusatz wird die anaerobe CO_2-Produktion intensiviert. Die nach NaF-Zusatz langsam einsetzende Hemmung der O_2-Aufnahme betrifft die CO_2-Abgabe weniger stark, und so kommt es zu erhöhten RQ-Werten. Auch die Acetaldehydausscheidung wärmevorbehandelter Sporen ist nach Zusatz von NaF m/10 und m/100 stark erhöht.

Diese Befunde sind schwierig zu deuten. Zwar ist eine RQ-Erhöhung nach Fluoridzugabe vielfach beobachtet worden, z. B. Bonner und Wildman 1946; Laties 1949; Harley und Smith 1956; die Ursache dafür konnte jedoch nicht geklärt werden. Einerseits könnte eine gegenüber der Enolase vergleichsweise stärkere Blockierung des Elektronentransports (Borei 1945; Lundegårdh 1954) bzw. die Hemmung der

Succino-dehydrogenase (BONNER 1951; SLATER und BONNER 1951) eine verstärkte Acetaldehydbildung und die Erhöhung der RQ-Werte erklären, andererseits wird dann aber der stimulierende Effekt auf die anaerobe CO_2-Entwicklung kaum deutbar. In welcher Weise NaF diese CO_2-Ausscheidung dahingehend beeinflußt, daß sie weniger rasch abklingt (NaF m/100) bzw. in stärkerem Maße erfolgt (m/10), muß offen bleiben. Ob andere Abbauwege eröffnet werden oder ob hier eventuell der durch NaF induzierten Decarboxylierung von Glutaminsäure (WARBURG et al. 1957) eine Bedeutung zukommt, ist zunächst noch nicht zu entscheiden.

Der Versuch, durch eine sehr niedrige NaF-Konzentration, die die O_2-Aufnahme in den ersten Versuchsminuten nicht beeinflußt (z. B. m/400 vgl. RUDOLPH 1960a), die Acetaldehydentwicklung 3 min 54° C wärmevorbehandelter Sporen herabzusetzen (analog der Wirkung von Jodessigsäure), ist fehlgeschlagen. Die Acetaldehydausscheidung war gegenüber der Kontrolle unverändert.

C. Besprechung der Versuchsergebnisse

Versucht man die bisher zur Frage der Wärmeaktivierung an den Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* erarbeiteten Daten zusammenzufassen und zu diskutieren, so soll zunächst daran erinnert werden, daß Daten über den Ruhezustand der Sporen im Sporangium vorerst nicht verfügbar sind. Die O_2-Aufnahme der Sporen in destilliertem Wasser ist der erste erfaßte Wert. Die Rate der O_2-Aufnahme bleibt unter diesen Bedingungen über mehrere Stunden hin konstant ($Q_{O_2} = 0{,}185 \pm 0{,}049$). Aus Messungen in destilliertem Wasser wird man nur mit größter Vorsicht Schlüsse ziehen dürfen[1]; doch ging es in diesem Zusammenhang nur darum, diese Größe kennen zu lernen, da vor jedem Experiment die Sporen destilliertes Wasser passieren. Darüber hinaus wird man aber annehmen dürfen, daß die Atmungsintensität der reifen, ruhenden

[1] Leider sind zum Teil wesentliche Experimente an *Neurospora*-Ascosporen (GODDARD; SUSSMAN u. Mitarb.) ebenfalls nur in destilliertem Wasser bzw. Phosphatpuffer durchgeführt worden, so daß sie mit der Frage belastet werden müssen, ob das beobachtete Reaktionsverhalten wirklich „normal" ist. Zwar liegen die Verhältnisse bei *Neurospora* insofern günstiger, als die Ascosporen nach Wärmevorbehandlung — im Gegensatz zu *Phycomyces*-Sporen — in destilliertem Wasser zu keimen vermögen und damit wohl über größere Mengen an mobilisierbarem Reservesubstrat verfügen. Doch besteht — neben der Tatsache, daß destilliertes Wasser ein unphysiologisches Versuchsmedium ist — bei längeren Versuchszeiten und fehlendem exogenen Substrat durchaus die Gefahr, daß Reaktionsfolgen eintreten, die für das „normale" keimungsphysiologische Verhalten nicht typisch sind. Unter diesem Gesichtspunkt ließe sich z. B. bei fehlendem exogenen Substrat der nach 120—140 min einsetzende Abfall des RQ-Wertes sehen (SUSSMAN et al. 1956), der bei gebotener Glucose (SUSSMAN et al. 1958) ausbleibt. Vgl. auch Fußnote 1 S. 305.

Sporen im Sporangium auch etwa in dieser Größenordnung (vielleicht etwas niedriger?) liegt.

Bei der Überführung der Sporen in Nährlösung steigt die O_2-Aufnahme um etwa eine Zehnerpotenz an. $Q_{O_2} = 1{,}92 \pm 0{,}23$. Die CO_2-Abgabe ist anfangs etwas geringer, $RQ < 1$. Trotz dieses erheblichen Atmungsanstieges sind nach 12 Std Bebrütungszeit nur 1—2% der Sporen gekeimt (Kriterium: Vacuolenbildung). Werden die Sporen in destilliertem Wasser 3 min bei 50° C wärmevorbehandelt und anschließend in Standard-Nährlösung überimpft, dann liegt die Atmung erheblich höher; die O_2-Aufnahme erfolgt anfangs (0—100 min nach Versuchsbeginn) mit konstanter Rate $Q_{O_2} = 11{,}39 \pm 1{,}25$, steigt dann aber rasch an; außerdem tritt im Anschluß an die Wärmevorbehandlung ein Extra-CO_2-Ausstoß auf, $RQ > 1$.

Gegenüber unvorbehandelten Sporen in destilliertem Wasser ist die O_2-Aufnahme somit um das 62fache angestiegen, ein Betrag, der wahrlich zur Feststellung ausreicht, daß den Sporen ein relativ leistungsfähiges Atmungssystem zur Verfügung steht. Es scheint aber so, als ob mit dem so erreichten Maß nahezu die maximale Leistungsfähigkeit bei dem vorliegenden Substrat erreicht ist, zumindest kann weder durch Erhöhung der Vorbehandlungstemperatur noch durch Verlängerung der Vorbehandlungszeiten (bei 50° C) die O_2-Aufnahme weiter gesteigert werden. Interessant ist auch in diesem Zusammenhang, daß durch das Entkoppelungsgift DNP die O_2-Aufnahme wärmevorbehandelter Sporen nur noch maximal um 30% zu steigern ist, ein Resultat, das — wenn es nicht vornehmlich auf einer sehr früh einsetzenden Hemmwirkung von DNP beruht — zur Beleuchtung dieser Frage beitragen könnte.

Diese Atmungssteigerung ist aber nur Folge, nicht Glied der Aktivierungsvorgänge, da der Aktivierungsvorgang sauerstoffunabhängig ist (Halbsguth und Rudolph 1959).

Auch deuten die vorliegenden Experimente darauf hin, daß es sich bei der Brechung der Keimruhe durch Wärme nicht speziell um die Aktivierung von Atmungsenzymen handelt. Es ist überhaupt die Frage, ob es berechtigt ist, nach einem speziellen Block in den ruhenden Sporen zu suchen, denn man sollte bedenken, daß die Aktivierung durch Wärme nur eine Möglichkeit unter mehreren ist, Sporen zur Keimung anzuregen. Versucht man dann, den Komplex der Keimungsförderung durch Wärme zusammen mit der keimungsfördernden Wirkung von Acetaldehyd, Glyoxylsäure, Acetat, Hypoxanthin usw. zu diskutieren, so müßte man unter Annahme *eines* speziellen Blocks (z. B. ein inaktives Atmungsenzym) fordern, daß alle keimungsfördernden Verbindungen in ihrer Wirkung letztlich darin münden, diesen Block zu beseitigen, eine Vorstellung, die abwegig erscheint.

Abgesehen von der Atmungssteigerung erscheint der Ausstoß von Extra-CO_2 im Anschluß an die Wärmeaktivierung sehr bedeutsam; die Menge des ausgeschiedenen Extra-CO_2 und die Bildungsdauer werden

durch die Höhe der Vorbehandlungstemperatur und deren Dauer bestimmt. Darüber hinaus scheiden aktivierte Sporen im Gegensatz zu unvorbehandeltem Sporenmaterial Acetaldehyd und Äthanol in die Nährlösung aus. Macht man für eine abschätzende Betrachtung einmal die Annahme, daß dieser Acetaldehyd- und Äthanolbildung eine Gärung nach dem Embden-Meyerhof-Schema zugrunde liegt, dann könnte nur ein Teil des gemessenen Extra-CO_2 als Folge einer aeroben Gärung gedeutet werden (vgl. hierzu S. 292). Größere Mengen Äthanol und Acetaldehyd werden sicher nicht in den Sporen angereichert, da es sich um leicht permeierende Verbindungen handelt. Doch ist es auch unwahrscheinlich — da sich das System nicht im Gleichgewicht befindet —, daß die CO_2-Menge und dazugehörige Gärungsprodukte bei den kurzen Meßzeiten zusammen erfaßt werden. Darüber hinaus ist die Frage noch unbeantwortet, ob Verbindungen, wie Acetoin, 2,3-Butylenglykol usw. entstehen; man wird auch durchaus mit der Möglichkeit rechnen müssen, daß entstehender Acetaldehyd wiederum in den Stoffwechsel mit einbezogen wird, da es sich nachweisen ließ, daß unvorbehandelte Sporen durch Acetaldehyd aktivierbar sind (BRINCKMANN 1960; RUDOLPH 1960b, 1961).

Selbst wenn sich später, nach Berücksichtigung zur Zeit noch nicht überschaubarer Nebenreaktionen, herausstellt, daß ein erheblich größerer Anteil des Extra-CO_2 einer aeroben Gärung entstammt als es zur Zeit den Anschein hat, dann deuten doch die bereits vorliegenden Experimente mit DNP darauf hin, daß wahrscheinlich ein bestimmter Anteil des Extra-CO_2 aus einer bzw. weiteren Reaktionsfolge(n) entstammt. In der Konzentration m/10000, in der die Keimung wärmevorbehandelter Sporen durch DNP völlig unterbunden wird, ist die Extra-CO_2-Menge zunächst herabgesetzt, dann aber gegenüber der Kontrolle erhöht, so daß schließlich über längere Zeit ein erhöhter RQ erhalten bleibt. Wenn trotz des verringerten Extra-CO_2 nach DNP-Zusatz die Acetaldehyd- (und Äthanol- ?[1]) produktion ansteigt, dann ist dies nur vorstellbar, wenn ursprünglich ein Teil des CO_2 nicht aus einer aeroben Gärung, sondern einem anderen Reaktionskomplex entstammt, der durch DNP stark blockiert wird. Darüber hinaus müßte DNP die Gärung stimulieren — letzteres eine mehrfach beobachtete Erscheinung.

Nimmt man nun an, daß durch den Wärmeschock der einleitende Kohlenhydratabbau außerordentlich stark stimuliert wird, so daß — trotz der 62fach gesteigerten O_2-Aufnahme — die oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure nicht voll gewährleistet ist, so könnte es zu einem erhöhten Pyruvatspiegel kommen. Die Folge der zu geringen Kapazität des oxydativen Endabbaus wäre dann eine Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd, der dann zu Äthanol reduziert

[1] Vgl. hierzu Fußnote 2 S. 300.

wird in dem Maße, in dem er als H_2-Acceptor dient[1]. Nach und nach wird dann der einleitende Kohlenhydratabbau ins rechte Verhältnis zu den oxydativen Abbaumöglichkeiten rückreguliert, die Äthanol- und Acetaldehydausscheidung klingt ab.

Wenn die Bildung von Acetaldehyd und Äthanol die Folge eines im Vergleich zu den oxydativen Decarboxylierungsmöglichkeiten zu starken Zuflusses von Brenztraubensäure ist, dann müßte man in Anlehnung an die Versuche von LUNDSGAARD (1930)[2] und HOLZER (1953)[2] mit Jodessigsäure in geeigneter Konzentration den verstärkten Zufluß von Brenztraubensäure durch Herabsetzung der Bildungsgeschwindigkeit von Phosphoglycerinsäure-1,3-diphosphat drosseln und damit die Acetaldehydausscheidung herabsetzen können. Dies ist der Fall (vgl. S. 294f.). Die Acetaldehydproduktion von Sporenmaterial, das 3 min bei 54° C wärmevorbehandelt wurde, kann durch Jodessigsäure 269×10^{-6} molar sehr stark herabgesetzt werden, ohne daß es zu diesem Zeitpunkt zu einer signifikanten Beeinflussung des Gaswechsels kommt.

Umgekehrt müßte es möglich sein, durch Verminderung der Leistungsfähigkeit des oxydativen Endabbaus 3 min bei 50° C wärmevorbehandelten Sporen die Bildung von Acetaldehyd und Äthanol zu verstärken[3].

[1] SUSSMAN u. Mitarb. (1956) deuten ihre Experimente bei *Neurospora*-Ascosporen ähnlich. Oxydative Abbaumöglichkeiten sollen im Anschluß an die Wärmeaktivierung erst nach und nach eröffnet werden, und im Zuge damit die nach der Aktivierung eingesetzte Gärung abklingen, bis sich schließlich bei Austritt der Keimschläuche ein voll funktionstüchtiger Endabbau eingespielt hat. Da aber nach etwa 120 min das primäre, endogene Substrat Trehalose (SUSSMAN und B. T. LINGAPPA 1959) weitgehend veratmet ist (werden die Keimschläuche gebildet, dann ist das Material weitgehend aufgebraucht), erhöht sich der prozentuale Anteil des Fettabbaues (B. T. LINGAPPA und SUSSMAN 1959), der RQ fällt (SUSSMAN et al. 1956). Da in den Versuchen, in denen Brenztraubensäure, Acetaldehyd und Äthanol bestimmt wurden (SUSSMAN et al. 1956), vermutlich kein exogenes Kohlenhydrat-Substrat angeboten worden war (das nachweislich — SUSSMAN et al. 1958 — den Abfall des RQ nach 120—140 min verhindert), bleibt die Frage offen, ob der Abbau des Pyruvatspiegels (und damit die verringerte Ausscheidung von Äthanol und Acetaldehyd) wirklich die Folge eines inzwischen leistungsfähigeren Endabbaus ist oder ob nicht infolge der vorwiegenden Umstellung des Stoffwechsels auf ein anderes endogenes Substrat die Situation verändert wird!

[2] Infolge partieller Inaktivierung der Phosphoglycerinaldehyd-dehydrogenase durch Jodessigsäure in geeigneter Konzentration kann die aerobe Gärung von Hefezellen vermindert werden, ohne daß zunächst die Atmung herabgesetzt wird. Da nach HOLZER und GOEDDE (1957) die Michaeliskonstanten der Brenztraubensäureoxydase ($K_M = 10^{-4}$ Mol/Liter) und Brenztraubensäuredecarboxylase ($K_M = 10^{-3}$ Mol/Liter) um eine Zehnerpotenz verschieden sind, wird in diesem Falle die Verminderung der Gärung nach Jodessigsäurezusatz bei unbeeinflußter Atmung gut deutbar.

[3] In einem größeren Ausmaß darf dies allerdings nicht erwartet werden, da unter anaeroben Bedingungen die Summe von ausgeschiedenem Äthanol und Acetaldehyd geringer ist (vgl. S. 290).

So kann mit Hilfe von Malonsäure und Fluoressigsäure, die beide im Citronensäure-Cyclus zu blockieren vermögen, die Acetaldehydausscheidung erhöht werden. Die Inhibitoren setzen die O_2-Aufnahme herab, die Extra-CO_2-Menge wird größer bzw. bleibt unverändert. Eine vermehrte Acetaldehyd-(und Äthanol?-)ausscheidung wäre bei unveränderter CO_2-Menge aber nur möglich, wenn der Anteil des Extra-CO_2, der nicht aus der aeroben Gärung stammt, entsprechend den Überlegungen zur DNP-Wirkung herabgesetzt würde.

Den wärmevorbehandelten Sporen kommt nicht die Fähigkeit zu, unter anaeroben Bedingungen eine stärkere Gärung durchzuführen. Die ausgeschiedene CO_2-Menge sowie die Summe von nachweisbarem Äthanol + Acetaldehyd sind geringer als unter aeroben Bedingungen. Vermutlich ist das Ausmaß der anaeroben Gärung noch geringer als es nach den gemessenen Gärungsprodukten den Anschein hat, denn während der Wärmevorbehandlung und für kurze Zeit danach (vgl. die Angaben der Methodik) befinden sich die Sporen noch unter aeroben Bedingungen; erst dann entfällt nach Durchleiten von N_2 der Sauerstoff, und das Stoffwechselgeschehen wird herabgesetzt. So ist es wahrscheinlich, daß es sich zum großen Teil bei diesen gemessenen CO_2-, Äthanol- und Acetaldehydmengen noch um aus der aeroben Vorbehandlungsphase abklingende Stoffwechselvorgänge handelt. Da somit den wärmevorbehandelten Sporen das Vermögen, auf einen gut funktionierenden Gärungsmechanismus umzuschalten, fehlt, kommt das durch den Wärmeschock gerade stimulierte Stoffwechselgeschehen wieder zum Erliegen[1].

Wenn dabei der Quotient Äthanol/Acetaldehyd verglichen mit aeroben Bedingungen kleiner wird, dann ist dieses zunächst überraschend. Denn eigentlich sollte der Acetaldehyd als Wasserstoffacceptor dienen können. Die Affinität eines anderen Systems zum Wasserstoff muß somit größer sein als die der Äthanoldehydrogenase. So wird z. B. verschiedentlich bei Pilzen über eine verstärkte Mannitbildung unter anaeroben Bedingungen berichtet (vgl. SCHMIDT-LORENZ 1956, dort auch weitere Literatur). Wenn der sonst zur Reduktion von Acetaldehyd benutzte Wasserstoff zur Mannitbildung abgezogen wird, dann wäre die verringerte Äthanolausscheidung verständlich.

Schwer zu beantworten ist zur Zeit noch die Frage, aus welcher der vielen möglichen Reaktionsfolgen das Extra-CO_2 entstammt, das möglicherweise nicht aus Gärungsvorgängen erklärt werden kann. Da dieser CO_2-Anteil aber auch, wie eine Überschlagsrechnung zeigt, beim Übergang zu anaeroben Bedingungen stark herabgesetzt wird, ist dies zumindest ein Hinweis, daß dieses CO_2 nicht aus spontanen Decarboxy-

[1] Hier läßt sich gut eine früher gemachte Beobachtung (HALBSGUTH und RUDOLPH 1959) anschließen. Unter anaeroben Bedingungen bilden wärmevorbehandelte Sporen keine Vacuolen aus. Es erfolgt eine Inaktivierung, es wird wieder ein Ruhezustand erreicht, ein Verhalten, das in guter Übereinstimmung mit dem hier gefundenen, fehlenden Gärungsvermögen steht.

lierungen, die im Anschluß an die Wärmeaktivierung etwa infolge einer Schädigung ablaufen, stammt. Auch die Möglichkeit, daß es sich um die Entleerung eines CO_2-Reservoirs im Anschluß an die Wärmevorbehandlung handelt, scheidet aus den gleichen Gründen aus (vgl. hierzu auch RUDOLPH 1960a). Daß eventuell das CO_2 aus Decarboxylierungen im Rahmen des oxydativen Endabbaus stammt, wäre denkbar, wenn man annimmt, daß der den oxydativen Endabbau begrenzende Faktor die zu geringe Leistungsfähigkeit eines der H_2 transportierenden (oder äquivalente) Systeme ist; dann wären bei Anwesenheit anderer reduzierbarer Verbindungen im Cyclus zunächst noch Decarboxylierungen möglich[1]. Umgekehrt kann man auch die Frage stellen, ob nicht im Anschluß an die Wärmeaktivierung für Enzymaktivitäten notwendige Hydrierungen der Reaktion mit dem Luftsauerstoff vorgezogen werden. Die die Äthanol-, Acetaldehyd- und Extra-CO_2-Ausscheidung stärker stimulierende Wirkung der Vorbehandlungstemperatur 54° C könnte dann als Folge einer vermehrten Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd gedeutet werden, da durch die erhöhte Vorbehandlungstemperatur der oxydative Endabbau geschädigt ist (O_2-Aufnahme nur noch 72% der Kontrolle). Infolgedessen ist dann auch vermutlich die ATP-Synthese herabgesetzt, und möglicherweise erfolgt zusätzlich über den damit erhöhten Orthophosphatspiegel (LYNEN 1941; JOHNSON 1941) noch eine weitere Stimulierung des einleitenden Kohlenhydratabbaus.

Nach einer Wärmevorbehandlung müßte es somit nach der bisher entwickelten Vorstellung zu einem Aufstau und zu Hydrierungen der verschiedensten Verbindungen kommen. Es wäre denkbar, daß es infolge des damit verbundenen Abflusses von Verbindungen in Stoffwechselkanäle, die im Ruhestoffwechsel nicht versorgt worden wären — auf Grund einsetzender Synthesevorgänge —, zur Überwindung des Ruhezustandes kommt[2]. Möglicherweise ergibt sich von dieser Vorstellung aus auch ein Zugang zum Verständnis der keimungsfördernden Wirkung der verschiedenen anderen Verbindungen[3]. Das soll nicht bedeuten, daß damit der Vorstellung von HOLZER (1953), HOLZER, HOLZER und SCHULTZ (1955) — daß das Wachstum letztlich die Folge eines „Synthesedruckes" darstellt, — hier uneingeschränkt zugestimmt werden soll, doch

[1] Bei Anwesenheit reduzierbarer Verbindungen könnte das Extra-CO_2 auch aus dem Hexose-monophosphat-Weg stammen.

[2] Mit Acetaldehyd (BRINCKMANN 1960, RUDOLPH 1960, 1961), Glyoxylsäure (BRINCKMANN 1960), Essigsäure, Brenztraubensäure, Propionsäure (ROBBINS et al. 1942; SOMMER u. HALBSGUTH 1957), Hypoxanthin, Faktor Z_2, Pyridin usw. (ROBBINS et al. 1942) kann die Keimruhe unvorbehandelter Sporen gebrochen werden.

[3] Vgl. hierzu auch die Überlegungen von BRINCKMANN (1960) zur Wirkung der Glyoxylsäure!

könnte diese Vorstellung bei der Umschaltung des Ruhestoffwechsels der Sporen durchaus bedeutsam sein.

Völlig offen bleibt nach all diesen hypothetischen Erwägungen noch die Frage, wie es infolge der Wärmewirkung zu der hier im Rahmen der Betrachtung geforderten starken Stimulierung der einleitenden KH-Abbauvorgänge kommt. Denkbar wäre, daß infolge der Temperaturerhöhung für das Plasma die Gefahr einer Denaturierung oder zumindest einer strukturellen Veränderung besteht, und daß es eines erhöhten Energieaufwandes bedarf, um die Plasmastruktur nicht irreversibel zu schädigen; dann wäre durch einen plötzlich abfallenden ATP-Spiegel und dem damit verbundenen Anstieg an Orthophosphat und ADP ein Weg aufgezeichnet, der zum Anstoß des Stoffwechselgeschehens führen könnte. Ob ein fallender ATP-Spiegel eventuell die „Anlasserfunktion" übernimmt, wird unter anderem zur Zeit geprüft.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

1. Wärmevorbehandelte Sporen scheiden im Gegensatz zu unvorbehandelten Äthanol und Acetaldehyd in die Nährlösung aus.

2. Die in die Nährlösung ausgeschiedene Gesamtmenge von Äthanol + Acetaldehyd ist unter anaeroben Bedingungen geringer als unter aeroben.

3. Durch Erhöhung der Vorbehandlungstemperatur (z. B. von 50° auf 54° C) wird sowohl die aerobe wie anaerobe Äthanol- und Acetaldehydproduktion verstärkt.

4. Jodessigsäure verhindert in der Konzentration 538×10^{-4} und 538×10^{-5} molar die Vacuolenbildung 3 min bei 50° C wärmevorbehandelter Sporen. Jodessigsäure in der Konzentration 269×10^{-6} molar setzt die Acetaldehydausscheidung 3 min bei 54° C wärmevorbehandelter Sporen herab, während der Gaswechsel zunächst unbeeinflußt bleibt.

5. Fluoressigsäure hemmt sehr stark die Keimschlauchbildung wärmevorbehandelter Sporen, z. B. 100% bei der Inhibitorkonzentration von m/20000. Fluoressigsäure m/100 setzt die O_2-Aufnahme stark herab und erhöht die Acetaldehydausscheidung.

6. Malonsäure wirkt erst bei relativ hohen Konzentrationen, z. B. 0,1 molar stärker hemmend auf den gesamten Keimungsvorgang. In der Konzentration m/100 läßt sich eine Verstärkung der Acetaldehydausscheidung bei kurzfristig verringerter O_2-Aufnahme nachweisen.

7. DNP erhöht sehr stark die Acetaldehydausscheidung 3 min bei 50° wie 54° C wärmevorbehandelter Sporen, setzt aber im gleichen Zeitraum auch die Extra-CO_2-Ausscheidung herab.

8. Es wird versucht, die bisher zur Frage der Wärmeaktivierung an Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* gewonnenen Ergebnisse in einer Arbeitshypothese zusammenzufassen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für ihre Unterstützung gedankt, wie auch Frl. W. Rehder für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

Barron, E. S. G.: Thiol groups of biological importance. Advanc. Enzymol. **11** (1951).

Beevers, H.: Malonic acid as an inhibitor of maize root respiration. Plant Physiol. **27**, 725—735 (1952).

— 2,4-Dinitrophenol and plant respiration. Amer. J. Bot. **40**, 91—96 (1953).

Bonner, J., and S. G. Wildman: Enzymatic mechanisms in the respiration of spinach leaves. Arch. Biochem. **10**, 497—518 (1946).

Bonner, W. D.: Activation of the heart-muscle succinic oxidase system. Biochem. J. **49**, viii—ix (1951).

Borei, H.: Inhibition of cellular oxidation by fluoride. Ark. Kemi, Mineral. Geol. A **20**, No 8, 1—215 (1945).

Brinckmann, M.: Über das die Keimung von *Phycomyces*-Sporangiosporen fördernde Prinzip heiß-sterilisierter Glucose-Substrate. Arch. Mikrobiol. **37**, 161—187 (1960).

Brody, Th. M.: The uncoupling of oxidative phosphorylation as a mechanism of drug action. Pharmacol. Rev. **7**, 335—363 (1955).

Bücher, Th., u. H. Redetzki: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. Klin. Wschr. **29**, 615—616 (1951).

Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure. Das Coenzym A und seine Acylderivate im Stoffwechsel der Zelle. Stuttgart: Ferdinand Enke 1959.

Evans, F. R., and H. R. Curran: The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic aerobic bacteria. J. Bact. **46**, 513—523 (1943).

Foster, J. W.: Chemical activities of fungi. New York: Academic Press Publ. 1949.

Goddard, D. R.: The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of *Neurospora tetrasperma*. J. gen. Physiol. **19**, 45—60 (1935).

— The reversible heat activation of respiration in *Neurospora*. Symp. Quant. Biol. **7**, 362—376 (1939).

—, and P. E. Smith: Respiratory block in the dormant spores of *Neurospora tetrasperma*. Plant Physiol. **13**, 241—264 (1938).

Hackett, D. P.: Respiratory inhibitors. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 12/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Halbsguth, W., u. H. Rudolph: Untersuchungen über die Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. I. Arch. Mikrobiol. **32**, 296—308 (1959).

Hanly, V. F., K. S. Rowan and J. S. Turner: Malonate and carrot root respiration. Aust. J. sci. Res. **5**, 64—95 (1952).

Harley, J. L., and D. C. Smith: Sugar absorption and surface carbohydrase activity of *Peltigera polydactyla* (Neck.) Hoffm. Ann. Botany **20**, 513—543 (1956).

Holzer, H.: Über Fermentketten und ihre Bedeutung für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels in lebenden Zellen. 4. Colloquium der Ges. für Physiolog. Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.

HOLZER, H.: Aerobe Gärung und Wachstum. 8. Colloquium der Ges. für Physiolog. Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
—, u. H. W. GOEDDE: Zwei Wege von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A in Hefe. Biochem. Z. **329**, 175—191 (1957).
— E. HOLZER u. G. SCHULTZ: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. Biochem. Z. **326**, 385—404 (1955).
JAMES, W. O.: The use of respiratory inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **4**, 59—90 (1953).
JOHNSON, M. J.: The role of aerobic phosphorylation in the Pasteur-effect. Science **94**, 200—202 (1941).
LARDY, H. A.: Energetic coupling and the regulation of metabolic rates. Proc. 3. Internat. Congr. Biochem., p. 287—294, 1956.
LATIES, G. G.: The role of pyruvate in the aerobic respiration of barley roots. Arch. Biochem. **20**, 284—299 (1949).
— Respiration and cellular work and the regulation of the respiration rate in plants. Surv. biol. Progr. **3**, 215—299 (1957).
LINGAPPA, B. T., and A. S. SUSSMAN: Endogenous substrates of dormant, activated and germinating ascospores of *Neurospora tetrasperma*. Plant Physiol. **34**, 466—472 (1959).
LINGAPPA, Y., and A. S. SUSSMAN: Changes in the heat-resistance of ascospores of *Neurospora* upon germination. Amer. J. Bot. **46**, 671—678 (1959).
LOWRY, R. J., A. S. SUSSMAN and B. v. BÖVENTER-HEIDENHAIN: Physiology of the cell surface of *Neurospora ascospores*. III. Distinction between the adsorptive and entrance phases of cation uptake. Mycologia **49**, 609—622 (1957).
LUNDEGÅRDH, H.: A new cytochrome in living roots. Nature (Lond.) **173**, 939—941 (1954).
LUNDSGAARD, E.: Die Monojodessigsäurewirkung auf die enzymatische Kohlenhydratspaltung. Biochem. Z. **220**, 1—7 (1930).
LYNEN, F.: Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. Ein Beitrag zur Kenntnis der Pasteurschen Reaktion. Justus Liebigs Ann. Chem. **546**, 120—141 (1941).
MEYER, F. R., u. G. RONGE: Entfernen von Sauerstoff aus Gasen mittels aktiven Kupfers. Angew. Chem. **52**, 637—638 (1939).
NEWCOMB, E. H.: Tobacco callus respiration and its response to 2,4-dinitrophenol. Amer. J. Bot. **37**, 264—271 (1950).
PRICE, C. A.: Malonate inhibition of α-Ketoglutaric oxidase. Arch. Biochem. **47**, 314—324 (1953).
PETERS, R. A.: Mechanism of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cymosum* and related compounds. Advanc. Enzymol. **18**, 113—159 (1957).
ROBBINS, W. J.: Growth substances in agar. Amer. J. Bot. **26**, 772—778 (1939).
— Growth substances and gametic reproduction by *Phycomyces*. Bot. Gaz. **101**, 428—449 (1939).
— Effect of extracts of *Phycomyces* upon its development. Amer. J. Bot. **27**, 559—564 (1940).
— Further observations on factor. Z. Bot. Gaz. **102**, 520—535 (1941).
—, and K. C. HAMNER: Effect of potato extracts on growth of *Phycomyces*. Bot. Gaz. **101**, 912—927 (1940).
—, and F. KAVANAGH: Guanine and factor Z_1, growth substances for *Phycomyces*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **28**, 4—8 (1942).
— — Hypoxanthine, a growth substance for *Phycomyces*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **28**, 65—69 (1942).
— — Vitamin deficiencies of the filamentous fungi. Amer. Bot. Rev. **8**, 411 (1942).

ROBBINS, W. J., V. W. KAVANAGH and F. KAVANAGH: Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. Bot. Gaz. **104**, 224—242 (1942).
—, and M. B. SCHMITT: Effect of cotton on the germination of *Phycomyces* spores. Bull. Torrey bot. Club **72**, 76—85 (1945).
— — Factor Z_2 and gametic reproduction by *Phycomyces*. Amer. J. Bot. **32**, 320 (1945).
RUDOLPH, H.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. Biol. Zbl. **77**, 385—437 (1958).
— Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. Planta (Berl.) **54**, 505—529 (1960).
— Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. II. Planta (Berl.) **55**, 424—437 (1960).
— Ein Beitrag zum Versuch der Kausalanalyse der Wärmeaktivierung der Sporen von *Phycomyces blakesleeanus*. Naturwissenschaften 1961 (im Druck).
— Über die keimungsfördernde Wirkung verschiedener Acetaldehydpräparate. Z. f. Naturforsch. 1961 (im Druck).
RUGE, U.: Zur Analyse der Saatguterhitzung von Malvaceen. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 409—417 (1955).
SCHMIDT-LORENZ, W.: Untersuchungen über den anaeroben Kohlenhydratstoffwechsel von *Aspergillus niger* VAN TIEGHEM. Arch. Mikrobiol. **25**, 137—165 (1956).
SHEAR, C. L., and B. O. DODGE: Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. J. agric. Res. **34**, 1019—1042 (1927).
SIMON, E. W.: Mechanisms of dinitrophenol toxicity. Biol. Rev. **28**, 453—479 (1953).
SLATER, E. C., and W. D. BONNER: Inhibition of the succinic oxidase system by fluoride. Biochem. J. **49**, 1—1i (1951).
SOMMER, L., u. W. HALBSGUTH: Grundlegende Versuche zur Keimungsphysiologie von Pilzsporen. Forschungsberichte des Wirtschafts- und Verkehrsministeriums Nordrhein-Westfalen Nr. 411, 1957.
STILL, J. L.: Alcohol enzyme of Bact. coli. Biochem. J. **34**, 1177—1182 (1940).
STOTZ, E.: A colorimetric determination of acetaldehyde in blood. J. biol. Chem. **148**, 585—591 (1943).
SUSSMAN, A. S.: The effect of furfural upon the germination and respiration of ascospores of *Neurospora tetrasperma*. Amer. J. Bot. **40**, 401—404 (1953).
— The effect of heterocyclic and other compounds upon the germination of ascospores of *Neurospora tetrasperma*. J. gen. Microbiol 8, 211—216 (1953).
— Changes in the permeability of ascospores of *Neurospora tetrasperma* during germination. J. gen. Physiol. **38**, 59—77 (1954).
— B. v. BÖVENTER-HEIDENHAIN and R. J. LOWRY: Physiology of the cell surface of *Neurospora* ascospores. IV. The functions of surface binding sites. Plant Physiol. **32**, 586—590 (1957).
— J. R. DISTLER and J. S. KRAKOW: Metabolic aspects of *Neurospora* activation and germination. Plant Physiol. **31**, 126—135 (1956).
— R. HOLTON and B. v. BÖVENTER-HEIDENHAIN: Physiology of the cell surface of *Neurospora ascospores*. Entrance of anions and nonpolar compounds. Arch. Mikrobiol. **29**, 38—50 (1958).
—, and B. T. LINGAPPA: Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. Science **130**, 1343 (1959).
THORN, M. B.: Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart-muscle preparations. Biochem. J. **54**, 540—547 (1953).

UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER: Manometric techniques. Minneapolis: Burgess Publ. 1949.

WARBURG, O., H. KLOTZSCH u. G. KRIPPAHL: Über die Funktion der Glutaminsäure in *Chlorella*. Z. Naturforsch. **12**b, 266 (1957).

— — — Glutaminsäure in *Chlorella*. Z. Naturforsch. **12**b, 622—628 (1957).

— — — Glutaminsäure-Decarboxylase in *Chlorella*. Naturwissenschaften **44**, 235 (1957).

YANG, W. C.: Effect of idioacetate and idioacetamide on oxygen uptake of heart mitochondria. Science **125**, 1087 (1957).

Dr. HANSJÖRG RUDOLPH,
Botanisches Institut der Universität Kiel
Düsternbrooker Weg 17

Planta 57, 313—330 (1961)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER DIE MUTATIVE ABÄNDERUNG PFLANZLICHER ORGANISATIONSMERKMALE*

Von

WERNER GOTTSCHALK

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Juli 1961)

A. Einleitung

Die Ausweitung der experimentellen Mutationsforschung hat vornehmlich bei Kultur- und Zierpflanzen in den vergangenen Jahrzehnten zur Bildung umfangreicher Mutanten-Sortimente geführt. Die bearbeiteten Mutationstypen werden im Hinblick auf den Grad ihrer Abweichungen von der Ausgangsform vielfach in drei Untergruppen aufgegliedert. Man spricht von Kleinst-, Klein- und Großmutationen, wobei die Veränderungen der erstgenannten beiden Gruppen innerhalb des Rahmens der Species als taxonomischer Einheit bleiben. Bei den sehr seltenen Großmutationen hingegen können als Folge eines einzigen Mutationsschrittes Merkmale zur Ausbildung kommen, die für verwandte Species oder gar Genera des verwendeten Versuchsobjekts charakteristisch sind. Derartige Formen sind für die Beurteilung phylogenetischer Fragestellungen von großem Interesse, weil sie dokumentieren, daß die Artgrenze unter Umständen in Verbindung mit einem einzigen Mutationsvorgang überschritten werden kann. Als klassische Beispiele derartiger Großmutationen sind bei pflanzlichen Objekten die „konstruktiven Mutationen" von *Marchantia* (BURGEFF 1941 a, b) sowie die *fistulata-*, *radialis-*, *transcendens-*, *trisepala-* und *Hirzina*-Mutanten von *Antirrhinum* zu nennen (STUBBE und v. WETTSTEIN 1941). In neuerer Zeit haben sich STUBBE (1952) bei *Lycopersicon*, NYBOM (1954) sowie GUSTAFSSON und v. WETTSTEIN (1956/57) bei *Hordeum*, ferner KAPPERT (1955) bei *Matthiola* mit dem Zusammenhang von Mutation und Evolution beschäftigt.

Für die Leguminosen erwähnt SCHMIDT (1911) das häufige Auftreten von Hülsenzwillingen und -drillingen als Folge einer Vermehrung der Anzahl der Carpelle bei *Phaseolus multiflorus*. Wenn hierüber auch keine genetischen Befunde vorliegen, so darf wohl mit Berechtigung angenommen werden, daß es sich bei den fraglichen Individuen um Mutanten handelte. Ganz entsprechende Formen erhielt RUDORF (1961)

* Herrn Professor Dr. WALTER SCHUMACHER zum 60. Geburtstag gewidmet.

bei *Phaseolus vulgaris* nach Anwendung von S^{35}. In die gleiche Gruppe scheint auch die von LAMPRECHT (1944) beschriebene *tripistillum*-Mutante von *Pisum sativum* sowie eine Komplexmutante von *Vicia faba* zu gehören (SCHEIBE und GOTTSCHALK 1956, GOTTSCHALK 1958). In all diesen Fällen ist der Grundbauplan der Leguminosenblüte durch eine monohybrid spaltende Mutation in der Weise abgeändert worden, daß anstelle eines einzigen Fruchtblattes mehrere Carpelle zur Ausbildung gelangen.

Trotz der Vielfalt des Mutationsgeschehens, die ihren Niederschlag in einer sehr großen Anzahl von Publikationen gefunden hat, liegen bisher nur wenige genetisch analysierte Beispiele von Mutanten vor, bei denen grundsätzliche Kennzeichen der Blütenstruktur und damit grundsätzliche Organisationsmerkmale des pflanzlichen Organismus im Sinne von STUBBE und v. WETTSTEIN (1941) verändert worden sind. In der vorliegenden Arbeit werden sechs derartige Mutationstypen von *Pisum sativum* behandelt. Sie wurden durch Röntgenbestrahlung ruhender Samen der Handelssorte „Dippes gelbe Viktoria-Erbse" mit 10 und 11 kr erhalten. Die Bestrahlungen wurden mit einer Röntgenapparatur vom Typ MG 150 der Firma Müller, Hamburg durchgeführt. Die Dosisausbeute betrug bei einem Focusabstand von 50 cm etwa 100 r/min (150 kV, 20 mA). Filter wurden nicht verwendet.

B. Empirischer Teil

Die normale Blüte der Species *Pisum sativum* zeigt als typische Schmetterlingsblüte eine Aufgliederung der Corolle in die Fahne, zwei Flügel und das Schiffchen, das durch Verwachsung der unteren beiden Petalen zustande kommt. Im Androeceum sind die Filamente von neun Staubblättern zu einer offenen Röhre verwachsen, während das zehnte frei ist; die Blüten besitzen folglich ein diadelphisches Androeceum. Die Gliederzahl der einzelnen Kreise erwies sich als weitgehend konstant, nach Berücksichtigung von 100 Blüten unserer Ausgangsform wurde keine Variabilität festgestellt.

Unser Mutanten-Sortiment enthält gegenwärtig nahezu 40 verschiedene Blütenmutanten, von denen fünf Genotypen spezifische Abweichungen aufweisen, die sich auf taxonomisch verwendbare Merkmale der Blütenstruktur beziehen. Es handelt sich hierbei um die Gliederzahl in bestimmten Kreisen, ferner um abweichende Verwachsungserscheinungen innerhalb der Corolle und des Androeceums, um die Persistenz der Corolle sowie um eine generelle Veränderung der Befruchtungsverhältnisse. Die Blütendiagramme der abweichenden Mutationstypen sind in Abb. 3 zusammengestellt. Als sechste Form ist eine Letalmutante in die Untersuchungen einbezogen worden, die durch eine äußerst charakteristische Anomalie im Aufbau ihres Sproßsystems phylogenetisch von Interesse ist.

1. Die morphologischen Verhältnisse der Mutanten

Die Mutante Nr. 10B. Die Blüten der sterilen Mutante Nr. 10B sind durch Reduktionserscheinungen in den mittleren beiden Kreisen gekennzeichnet. In der *Corolle* kommen nur die beiden Flügel zur Ausbildung,

während sich das *Androeceum* aus nur 8 Staubblättern zusammensetzt, deren Filamente zu einem offenen Rohr verwachsen sind (Abb. 1). Der Blütenbau entspricht somit der Formel K5 — C2 — A8 — G1, während die Normalform K5 — C5 — A10 — G1 hat. Das mutierte Gen soll

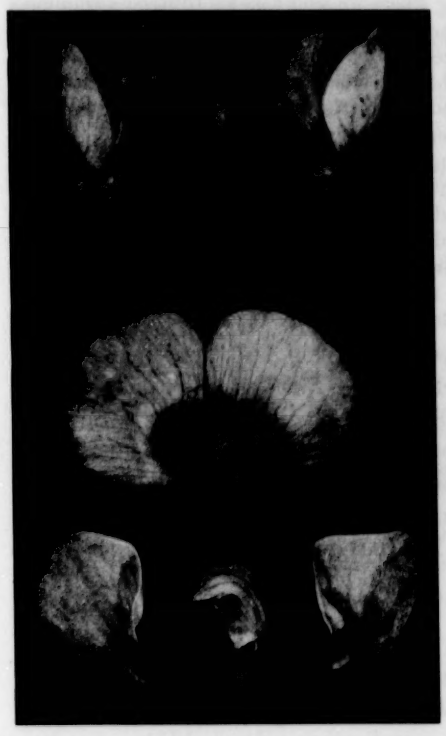


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Vergleich des Aufbaus der Corolle der Mutante Nr. 10 B (oben) mit der Normalform (unten). In den Blüten der Mutante kommen nur die beiden Flügel zur Ausbildung

Abb. 2. *Oben:* Die beiden Flügel und das Schiffchen einer normalen Erbsenblüte. *Unten:* Die entsprechenden Organe der Mutante Nr. 40. Jeder der beiden Flügel ist mit dem ihm benachbarten unteren Blütenblatt verwachsen, die Bildung des Schiffchens unterbleibt

wegen der abweichenden Gestaltung der Corolle mit dem Symbol *dip* (= *dipetala*) bezeichnet werden. Es sei erwähnt, daß der eben genannte Bauplan nicht generell, sondern vornehmlich in der ersten Hälfte der Blühperiode verwirklicht wird. Bei den später angelegten Blüten zeigt ein Teil der Sepalen eine carpellartige Gestaltung; außerdem wird die Gliederzahl des Kelchblattkreises häufig auf Kosten des Blütenblattkreises erhöht. In derartigen Blüten unterbleibt die Bildung der Corolle völlig.

Trotz des Gattungsreichtums der Familie der *Leguminosae* — sie gilt nach HEGI (1935) mit mehr als 500 Genera als die zweitgrößte Familie der Blütenpflanzen — sind in dieser systematischen Gruppe Reduktionserscheinungen im Blüten- und Staubblattkreis im Verlauf der Evolution offenbar nur selten wirksam geworden. Bei der besonders umfangreichen Unterfamilie der *Papilionatae* finden sich in der Tribus *Vicieae*, der die Gattung *Pisum* angehört, keine Blütendiagramme, die mit den Verhältnissen unserer Mutante vergleichbar sind. Einige nordamerikanische Genera der Tribus *Galegeae* zeigen jedoch gewisse Parallelen. Bei der Gattung *Paryella* z. B. fehlt der Blütenblattkreis völlig, bei *Amorpha* kommt nur die Fahne zur Ausbildung. Das gleiche gilt für die baum- und strauchförmigen Arten der süd- und mittelamerikanischen Gattung *Ateleia* der Tribus *Sophoreae*. Reduktionserscheinungen im Androeceum sind für die Gattung *Kuhnistera* der *Galegeae* bekannt: es sind nur fünf Staubblätter vorhanden. Berücksichtigen wir noch die anderen beiden Unterfamilien der *Leguminosae*, so wäre für einige Arten der Gattung *Mimosa* eine generelle Reduktion der Gliederzahl zu erwähnen; es werden drei- bzw. vierzählige Blüten gebildet. Beim Genus *Ceratonia* der Unterfamilie der *Caesalpinioideae* schließlich fehlt die Corolle völlig, während sie bei der Species *Bauhinia dipetala* eine Reduktion auf zwei Glieder erfahren hat.

Unter den bei ENGLER-PRANTL (1894) aufgeführten Genera der Familie der *Leguminosae* ist folglich der für die Mutante Nr. 10B von *Pisum sativum* charakteristische Blütenbauplan nicht vertreten. Er fügt sich als Reduktionstypus gut in die Reduktionsreihe

K5 — C5 — A10 — G1 (unreduzierter Normalzustand der *Papilionatae*),
K5 — C2 — A10 — G1 (*Bauhinia dipetala*, [*Caesalpinioideae*]),
K5 — C2 — A8 — G1 (Mutante Nr. 10B von *Pisum sativum*),
K5 — C1 — A10 — G1 (*Amorpha* [*Galegeae*], *Ateleia* [*Sophoreae*]),
K5 — C0 — A10 — G1 (*Paryella* [*Galegeae*])

der Familie ein. Die Veränderung der Blütenstruktur durch das Gen *dip* entspricht etwa den Verhältnissen, die STUBBE und v. WETTSTEIN (1941) bei den Mutanten *transcendens* und *trisepala* von *Antirrhinum* gefunden haben. Die beiden Genotypen kopieren damit blütenmorphologische Verhältnisse, die für andere Tribus und Genera der *Scrophulariaceae* charakteristisch sind.

Die Mutante Nr. 40. Die Mutante Nr. 40 ist zunächst durch den Besitz von zwei großen, gut ausgebildeten *Vorblättern* charakterisiert, die am Ansatzpunkt der Blütenstiele der zweiblütigen Inflorescenzen sitzen. Die Ausgangsform bildet in der Inflorescenzregion nur ein winziges Blättchen, das als rudimentäres Vorblatt gedeutet werden könnte. Bei anderen Sorten und Zuchtstämmen sind jedoch gelegentlich kleine Vorblätter vorhanden, die nach LAMPRECHT und MRKOS (1950) sowie LAMPRECHT (1953a) auf die Anwesenheit der beiden polymeren *dominanten* Gene *Br* und *Bra* zurückzuführen sind. Unsere Mutante unterscheidet sich sowohl in der Form als auch der Größe ihrer Vorblätter erheblich von derartigen Genotypen; das mutierte Gen zeigt außerdem einen *recessiven* Erbgang und soll in Anlehnung an die Lamprechtsche Nomenklatur mit dem Symbol *brac* bezeichnet werden. Es weist im Gegensatz

zu den Genen *Br* und *Bra* einen hohen Grad von Penetranz auf: das abweichende Merkmal tritt in seiner charakteristischen Ausprägung bei allen *brac brac*-Individuen in Erscheinung.

Im Blütenbau zeigen die Pflanzen dieses Genotypus eine zwar geringfügige, in taxonomischer Beziehung aber interessante Abweichung. Die Verwachsungsverhältnisse der Glieder des Blütenblattkreises sind insofern etwas verschoben, als die für die Unterfamilie der *Papilionatae* charakteristische Verwachsung der unteren beiden Petalen zum Schiffchen unterbleibt. Statt dessen ist jedes dieser beiden Blütenblätter mit dem ihm benachbarten mittleren Glied des Kreises — also mit je

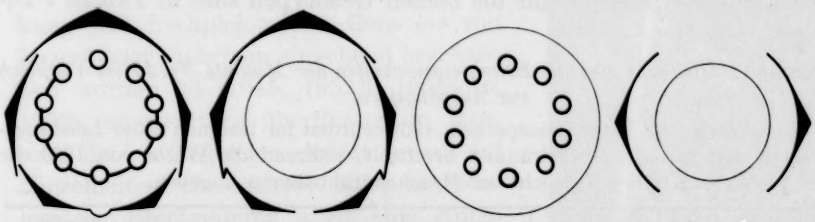


Abb. 3. Blütendiagramme der Normalform von *Pisum sativum* (links) sowie der Mutanten Nr. 40, 158 und 10 B. In den Zeichnungen sind jeweils nur die abweichenden Blütenkreise berücksichtigt (Erläuterung im Text)

einem Flügel — verwachsen (Abb. 2). Als Folge des Mutationsvorgangs ist die Gliederzahl des zweiten Kreises zwar nicht generell verändert worden, die Anzahl der *freien* Organe wird jedoch auf drei reduziert. Anstelle der üblichen Kombination

1 Fahne,
2 Flügel,
1 Schiffchen

tritt die Kombination

1 Fahne,
2 Verwachsungsprodukte aus je einem Flügel und einem der unteren beiden Petalen.

Das Blütendiagramm dieser Mutante ist in Abb. 3 dargestellt.

Soweit ich die Literatur überblicke, ist ein derartiger Bauplan bei keiner Gattung der Unterfamilie der *Papilionatae* verwirklicht. Die Verwachsungsverhältnisse der Blütenblätter stellen in dieser systematischen Gruppe fraglos ein bedeutsames Merkmal dar, das von Engler-Prantl (1894) für die weitere Aufgliederung der Tribus herangezogen wird. Die eben genannten Autoren geben zwar für mehrere Stämme (etwa die *Loteae*, *Vicieae*, *Phaseoleae* u. a.) ein leichtes Zusammenhängen von Flügel und Schiffchen an, es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine echte Verwachsung, außerdem kommt das Schiffchen in seiner typischen Gestaltung als Verwachsungsprodukt der beiden unteren Petalen zur Ausbildung. Bei den Gattungen *Apoplanesia* und *Eysenhardtia* der Tribus *Galegeae* sowie bei den Genera *Hymenolobium* und *Behaimia (Dahlbergieae)* unterbleibt zwar die Verwachsung des Schiffchens, es kommt jedoch nicht zu einer anderen Vereinigung der vorhandenen Petalen, es sind vielmehr alle fünf Glieder des Kreises frei. Andererseits sind bei der Gattung *Trifolium alle* Blütenblätter röhrenartig miteinander verwachsen. Die in Abb. 2 wiedergegebene Verwachsungsform der Mutante 40 von

Pisum sativum tritt also in keiner der bei ENGLER und PRANTL vertretenen Gattungen auf, sie stellt vielmehr ein Novum dar.

Mit der eben geschilderten Veränderung der Blütenstruktur ist keine prinzipielle Herabsetzung der Fertilität verbunden. Die Mutanten legen jedoch im ersten Viertel der Blühperiode häufig Knospen mit Anomalien im Bereich der Geschlechtsorgane an. In der Regel sterben die Organe derartiger Knospen bereits vor ihrer endgültigen Ausdifferenzierung unter degenerativen Erscheinungen ab. Dies dürfte wohl die Hauptursache für die in zweijährigen Ertragsbestimmungen festgestellte Fertilitätsminderung der Mutante gegenüber der Ausgangsform sein. Die Ertragsverhältnisse für die beiden Genotypen sind in Tabelle 1 zu-

Tabelle 1. *Übersicht über die Ertragseigenschaften der Mutante Nr. 40 im Vergleich zur Ausgangsform*

Die Werte der Vegetationsperiode 1959 wurden im Rahmen einer Leistungsprüfung mit geringen Standräumen ermittelt, während die Werte von 1960 die Ertragsleistungen bei Aufzucht an Maschendrahtzäunen angeben.

Genotypus	Versuchsjahr	Anzahl der Pflanzen	Gesamtzahl der Samen	Mittlerer Kornertrag je Pflanze	Ertragsleistung in Prozent der Ausgangsform
Ausgangsform	1959/1	200	1732	8,66	100,0
	1959/2	180	1673	9,29	100,0
	1959/1+2	380	3405	8,96	100,0
	1960	203	4847	23,88	100,0
Mutante Nr. 40	1959/1	240	1235	5,15	59,5
	1959/2	186	1155	6,21	66,8
	1959/1+2	426	2390	5,61	62,6
	1960	264	4279	16,21	67,8

sammengestellt. Sie wurden in der Vegetationsperiode 1959 im Rahmen einer Leistungsprüfung mit zwei Wiederholungen bei feldmäßigem Anbau mit engen Standräumen ermittelt, während die Pflanzen im Sommer 1960 an Maschendrahtzäunen mit größeren Standräumen aufgezogen wurden. Aus den Mittelwerten der Leistungsprüfung errechnet sich für die Mutante eine Ertragsleistung von 62,2% der Ausgangsform. Der in der Vegetationsperiode 1960 unter wesentlich günstigeren Lebensbedingungen ermittelte Wert von 67,8% liegt in der gleichen Größenordnung; der Grad der Abweichung von der Ausgangsform kann somit als gesichert betrachtet werden. Die Mutante ist also erwartungsgemäß durch einen negativen Selektionswert charakterisiert, es sei jedoch betont, daß sie in ihrer Eigenschaft als Blütenmutante auffallend günstige Fertilitätsverhältnisse aufweist (Näheres bei GOTTSCHALK 1960).

Die Mutante Nr. 158. Die Mutante Nr. 158 unseres Materials wurde bereits von LAMPRECHT (1945, 1956a) mehrmals teils spontan, teils nach

Röntgenbestrahlung gefunden und als „*laciniata*-Form" intensiv bearbeitet. Sie trat außerdem in experimentellen Mutationsversuchen von GELIN, EHRENBERG und BLIXT (1959) nach Einwirkung von Sauerstoff auf. Die Mutation von *Lac* nach *lac* konnte somit innerhalb weniger Jahre in fünf Fällen nachgewiesen werden; das Gen weist offenbar eine etwas höhere Mutationsneigung als andere Gene des Genoms von *Pisum sativum* auf. Unsere Mutante stimmt morphologisch weitgehend mit der *laciniata*-Form der eben genannten Autoren überein, so daß an der Identität der mutierten Gene nicht zu zweifeln ist. Da die äußerst vielgestaltige Wirkung des hochpleiotropen Gens *lac* von LAMPRECHT mehrfach eingehend beschrieben worden ist (1945, 1953b, 1956a, b, 1959), erscheint es überflüssig, im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut auf Einzelheiten einzugehen. Eine morphologische Beschreibung sowie eine Abbildung unserer Form findet sich bei GOTTSCHALK (1960). Es sei lediglich darauf hingewiesen, daß die Fiedern an ihrer Basis trichterartig verwachsen sind, außerdem zeigten die Fiederstiele unseres homozygoten Materials häufig eine charakteristische hyponastische Krümmung, so daß die Wirkung des mutierten Gens in mehrfacher Beziehung an die früher bearbeitete Mutante Nr. 300 von *Pisum sativum* erinnert (GOTTSCHALK und SCHEIBE 1960). Im *Blütenbau* ist besonders die monströse Gestaltung des weit geöffneten Gynaeceums zu erwähnen: der weitaus größte Teil der angelegten Samenanlagen wächst zu griffelähnlichen Organen aus (Abb. 4). Die weißlichgelben Antheren unseres Materials enthielten zwar ein Gemisch aus geschrumpften und morphologisch intakten Pollen; Befruchtungsversuche blieben jedoch erfolglos, so daß angenommen werden muß, daß die lebenden Pollenkörner nicht funktionsfähig sind.

Abb. 4. Geschlechtsorgane einer Blüte der Mutante Nr. 158. Die Verwachsung der Filamente unterbleibt, der Fruchtknoten ist weit geöffnet, die Samenanlagen wachsen zu griffelartigen Organen aus

Im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit behandelten Fragestellung ist vornehmlich die Gestaltung des *Androeceums* von Interesse: in den Blüten der Mutante Nr. 158 unterbleibt die für die *Papilionatae* charakteristische Verwachsung der neun Filamente regelmäßig, alle 10 vorhandenen Staubblätter sind vielmehr frei (Abb. 4). Das mutierte pleiotrope Gen ist folglich für die Ausprägung eines

systematisch bedeutsamen Merkmals verantwortlich, das in keiner der verwandten Gattungen der Tribus der *Vicieae* auftritt. Von den von ENGLER-PRANTL aufgeführten 10 Stämmen der *Papilionatae* ist diese Eigenart nur bei den außereuropäischen *Siphoreae* und *Podalyrieae* anzutreffen, während sie bei den anderen beiden Unterfamilien der *Leguminosae* — den *Mimosoideae* und *Caesalpinioideae* — weit verbreitet ist.

Die Mutanten Nr. 142A und 440D. Bei den bisher behandelten Genotypen besteht eine Teilwirkung der mutierten Gene darin, daß

Abb. 5. Blüten und Früchte der Mutante Nr. 440D im Vergleich zur Ausgangsform. Obere Reihe: Die Mutante mit vergrößerter Corolle und persistierenden Blütenblättern. In der unteren Reihe 2 entsprechende Entwicklungsstadien der Ausgangsform. Ganz rechts eine etwa 6 cm lange Hülse der Ausgangsform, links daneben eine gleichalte Hülse der Mutante mit noch immer voll turgescenten Petalen

bestimmte für die systematische Aufgliederung der *Papilionatae* bedeutsame Organisationsmerkmale der Blüte eine Abwandlung erfahren. Es sei nunmehr auf einige Mutanten eingegangen, die zwar gewisse Blütenanomalien aufweisen, bei denen der Grundbauplan der *Pisum*-Blüte jedoch erhalten geblieben ist. Trotzdem sind sie in phylogenetischer Beziehung von Interesse.

Die Blüten der *Mutante Nr. 440D* entsprechen in der Anordnung und Ausbildung ihrer Organe denen der Normalform. Ein auffallender Unterschied besteht lediglich darin, daß die etwas vergrößerten Petalen nach Vollzug der Befruchtung nicht abgeworfen werden. Sie bleiben vielmehr in voller Turgescenz mit der Basis der heranwachsenden Frucht verbunden und werden offenbar weiterhin mit Wasser und Assimilaten versorgt (Abb. 5). Eine Parallelerscheinung hierzu findet sich nach ENGLER-PRANTL (1894) bei der Serie *Intermedia* der dem Genus *Trifolium* zugehörigen Sektion *Eulagopus*. Die Species dieser Serie sind

unter anderem dadurch gekennzeichnet, daß die Blütenkrone während der Fruchtreife erhalten bleibt, während sie bei den anderen Gattungen der Unterfamilie der *Papilionatae* rasch abfällt. Ausnahmen hiervon machen außerdem noch die Serie *Euinvolucrarium* der Gattung *Trifolium*, bei der sich die Persistenz der Corolle jedoch auf die Fahne beschränkt sowie die brasilianische Gattung *Soemmeringia* der Tribus *Hedysareae*, bei der die Petalen nach der Befruchtung papierartig erhalten bleiben. Ohne Zweifel stellt das entsprechende Charakteristikum der Mutante Nr. 440 D von *Pisum sativum* ein Merkmal dar, das bei einigen wenigen anderen Gliedern der Unterfamilie der *Papilionatae* im Verlauf der Phylogenese zu einer bleibenden und damit systematisch verwertbaren Eigenart geworden ist. Die Mutante ist fertil, steht jedoch in der Samenproduktion deutlich hinter der Ausgangsform zurück.

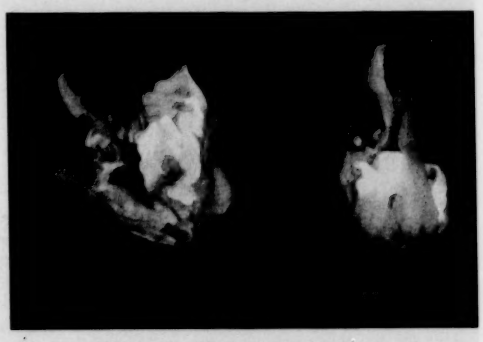


Abb. 6. Blüten der Mutante Nr. 142 A im Zustand voller Entfaltung. Die Petalen liegen mit dem Androeceum in zusammengeknüllter Form im Bereich des Kelches, während der Griffel mit der Narbe weit herausragt. Dadurch wird die Selbstbefruchtung zuverlässig unterbunden

Die in der *Befruchtungsform* einer Species zum Ausdruck kommenden blütenbiologischen Verhältnisse sind i.a. innerhalb der Art genetisch festgelegt und damit konstant. Bei *Pisum sativum* findet die Befruchtung in der noch geschlossenen Knospe statt, die Species gilt daher wegen der vorherrschenden Kleistogamie als zuverlässiger Selbstbefruchter. Bei der *Blütenmutante Nr. 142 A* wird die Autogamie auf eine eigenartige Weise verhindert: die Petalen bleiben während der Blütenentfaltung gemeinsam mit den Staubblättern in zusammengeknüllter Form im Bereich des Kelches. Die Blüten erhalten dadurch das Aussehen von Knospen, aus denen der Griffel weit herausragt (Abb. 6). In Testkreuzungen wurde nachgewiesen, daß beide Geschlechter funktionsfähig sind. Durch diese Anomalie, deren Folge eine räumliche Trennung von Narbe und Antheren ist, wird die für *Pisum* charakteristische Kleistogamie in eine obligatorische Fremdbefruchtung umgewandelt. Das mutierte Gen entfaltet eine pleiotrope Wirksamkeit und hat neben einer Verkürzung der Internodien und einer generellen Herabsetzung der Vitalität noch das Fehlen der Wachsschicht auf allen grünen Pflanzenteilen zur Folge.

In die gleiche Gruppe gehört eine größere Anzahl männlich-steriler Mutationstypen unseres Materials, die außer ihrem noch nicht analy-

sierten Defekt im Androeceum keine sonstigen habituellen Anomalien aufweisen. Da die Selbstbestäubung wohl zustande kommt, aber nicht zur Befruchtung führt, sind die Pflanzen in der Regel steril. Gelegentlich kommt Samenansatz zustande, aus den Samen entwickeln sich jedoch Bastarde. Damit ist der Übergang dieser Genotypen vom Selbst- zum obligatorischen Fremdbefruchter erwiesen.

Abb. 7. Zwei Exemplare der Letalmutante Nr. 60 A. Eine Hauptachse ist nicht vorhanden, das gesamte Sproßsystem wird vielmehr aus Seitensprossen und Beiknospen aus dem Bereich des Kotyledonarknotens aufgebaut. Links das Blatt einer gleichalten Pflanze der Ausgangsform

Die Mutante Nr. 60 A. Die genetisch fixierten Anomalien der bisher behandelten Mutationstypen bezogen sich im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit auf die Blütengestaltung. Wenn der Organisation der Blüte auch für die Beurteilung systematischer und damit phylogenetischer Gesetzmäßigkeiten eine dominierende Rolle zugesprochen werden muß, so können doch vereinzelt auch extraflorale Merkmale in systematischer Beziehung von Bedeutung sein. Ein derartiger Fall liegt meines Erachtens bei der Mutante Nr. 60 A vor. Diese leicht chlorophylldefekte Form gehört zur Gruppe der langlebigen Letalmutanten. Die Pflanzen sind zunächst durch ihre äußerst zögernde Anfangsentwicklung gekennzeichnet: sie durchbrechen das Erdreich erst 2—3 Wochen nach den gleichzeitig ausgelegten Normalformen. Ihre Sprosse bilden nur 2—3 winzig kleine Blätter und verharren dann wochenlang ohne nennenswerte Weiterentwicklung in diesem Zustand, ohne jemals in die generative Phase überzutreten. Die Pflanzen erreichen nur Gesamtlängen von 5—18 cm (Abb. 7).

Das wesentlichste Charakteristikum der Mutante besteht jedoch darin, daß der Spitzenvegetationskegel der jungen Keimpflanze seine

Entwicklung zwar beginnt, er stellt seine Funktion jedoch in frühesten Stadien der Ontogenese ein. Der Hauptsproß dieser Pflanzen besteht ausschließlich aus einem winzigen Epicotyl, das eine maximale Länge von nur 2—3 mm erreicht. In diesem Stadium degeneriert der Spitzenvegetationskegel. Bei Aussaat im Freiland spielen sich diese Vorgänge noch innerhalb des Erdreichs ab (*Pisum sativum* hat hypogäische Keimung), so daß der Hauptsproß als Organ morphologisch überhaupt nicht in Erscheinung tritt. Statt dessen bilden sich aus dem Kotyledonarknoten langsam ein oder zwei gleichwertige, korrespondierende Seitensprosse, die ihre Entwicklung jedoch nach Entfaltung von 2—3 Blättern einstellen. Später nehmen die in den Achseln der beiden Kotyledonen inserierten Beiknospen ihre Entwicklung auf und bilden zwei weitere Sprosse. Ein drittes Paar derartiger korrespondierender Seitentriebe tritt gelegentlich noch in die ersten Stadien der Entwicklung ein, die Pflanzen sterben jedoch in diesem Zustand meist ab.

Die Wirkung des mutierten Gens besteht also darin, daß durch den gesetzmäßigen Ausfall des Hauptvegetationskegels unmittelbar nach der Keimung die Bildung einer zentralen Achse verhindert wird. Das gesamte Sproßsystem dieser Organismen besteht vielmehr aus Seitenachsen, wobei es besonders bemerkenswert ist, daß der Aufbau dieses Sproßsystems unter Einbeziehung von Beiknospen aus dem Kotyledonarknoten erfolgt. Es entfällt somit das monopodiale Sproßsystem der normalen Erbse, statt dessen wird zunächst ein Verzweigungssystem angelegt, das ein Sympodium vortäuscht und in frühen Entwicklungsstadien bei oberflächlicher Betrachtung infolge der nahezu dekussierten Stellung der beiden Kotyledonen an der Hauptachse den Eindruck eines Dichasiums vermitteln könnte. Es ist jedoch nicht gerechtfertigt, diese Begriffe auf die bei der Mutante Nr. 60 A realisierten Verhältnisse anzuwenden. Läge ein echtes Sympodium vor, so müßte sich der Vorgang der Wachstumseinstellung des Spitzenvegetationskegels bei der Entwicklung der Seitentriebe wiederholen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nach dem Ausfall des Hauptsprosses übernehmen ein oder zwei Seitentriebe seine Funktion, ohne daß das Verzweigungssystem dieser Seitenachsen gegenüber der nicht mutierten Vergleichsform eine Veränderung erfährt. Die nur aus wenigen Nodi und Internodien zusammengesetzten Seitentriebe sind entweder unverzweigt, oder sie bilden kleine, untergeordnete Seitenzweige, verkörpern ihrerseits also Monopodien. Das mutierte Gen verursacht folglich keine prinzipielle Änderung des Verzweigungssystems, es sorgt lediglich dafür, daß die Hauptachse frühzeitig ausfällt. Der Organismus reagiert auf diesen Ausfall im Prinzip wie ein Individuum der nicht mutierten Ausgangsform, das man über den Kotyledonen dekapitiert und dadurch zur Regeneration aus dem Bereich des Kotyledonarknotens anregt (näheres bei GOTTSCHALK 1961).

Für diese in systematischer Beziehung zunächst belanglos erscheinende Teilwirkung des mutierten pleiotropen Gens findet sich bei den Leguminosen eine auffallende Parallele. Nach Untersuchungen von SANDT (1925) liegt die Hauptachse bei *Lotus tetragonolobus* nur in Form eines einzigen Internodiums, also des Epikotyls, vor. Das Sproßsystem wird von mehreren Beiknospen gebildet, die sich aus einem terminalen Meristem zwischen den Keimblättern bilden. Diese Verhältnisse entsprechen weitgehend dem Sproßaufbau unserer Mutante Nr. 60A. Daß die Individuen wegen der Letalwirkung des mutierten Gens nicht in der Lage sind, ein vollwertiges Sproßsystem aufzubauen, setzt den Wert dieses Vergleichs nicht herab.

2. Die Spaltungsverhältnisse der mutierten Gene

Die Spaltungsverhältnisse der mutierten Gene wurden für die Mutanten Nr. 40 und 142A nach Bastardierung mit der Ausgangsform in der F_2- und F_3-Generation erhalten. Die anderen Gene wurden wegen

Tabelle 2. *Übersicht über die Spaltungsverhältnisse der mutierten Gene*

Nummer der Mutante	Anzahl der spaltenden Familien	Normal	Mutiert	Gesamtzahl	Prozentualer Anteil der Mutanten	Homogenität[1]	Grad der Übereinstimmung mit der 3:1-Spaltung[1]
10 B	23	508	156	664	23,5	—	—
40	20	420	136	556	24,5	—	—
60 A	68	1509	143	1652	8,7	—	+++
142 A	9	101	20	121	16,5	—	+
158	14	286	103	389	26,5	—	—
440 A	14	190	73	263	27,8	—	—
440 D	16	238	48	286	16,8	—	++

[1] Es bedeuten: — nicht signifikant; + signifikant im Bereich $0{,}05 < P < 0{,}01$; ++ signifikant im Bereich $0{,}01 < P < 0{,}001$; +++ signifikant im Bereich $P < 0{,}001$.

der geringen Fertilität bzw. der Sterilität oder gar Letalität der betreffenden Mutanten in den Nachkommenschaften heterozygoter Pflanzen der X_3—X_6-Generation ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sowie die notwendigen statistischen Angaben sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Es fällt hierbei auf, daß nur die Daten der Mutanten Nr. 10B, 40, 158 und 440A im Streubereich der Erwartungswerte für eine 3:1-Spaltung liegen, während die restlichen Genotypen ein teilweise äußerst hohes Defizit an homozygot recessiven Organismen aufweisen, dessen Ursache noch nicht aufgeklärt werden konnte. So beträgt der Mutantenanteil beim Genotypus Nr. 60A nach Berücksichtigung von 68 spaltenden Familien nur 8,7%, liegt damit also im Bereich der Erwartungswerte

für einen dihybriden Mendelfall. Trotzdem kann mit Sicherheit ein monohybrider Erbgang angenommen werden, der wahrscheinlich durch Gonenkonkurrenz gestört wird. In Gewächshausanzuchten wurde für die nicht spaltenden Familien dieser Sippe ein Überlebenswert von 97,46% der ausgelegten Samen ermittelt; der Vergleichswert der spaltenden Familien des gleichen Materials lag bei 97,34%. Das Recessivendefizit kann folglich nicht durch einen frühzeitigen Ausfall mutierter Organismen unmittelbar nach der Keimung erklärt werden. Ähnliche Verhältnisse dürften auch bei den Mutanten Nr. 142A und 440D vorliegen. Die Homogenitätsprüfung ergab für alle bearbeiteten Mutationstypen Homogenität.

C. Theoretischer Teil

Erfahrungsgemäß sind selbst in sehr umfangreichen Mutanten-Sortimenten nur wenige Genotypen für die Bearbeitung phylogenetischer Fragestellungen geeignet. Die im empirischen Teil der vorliegenden Arbeit behandelten sechs Mutanten von *Pisum sativum* stellen neue genetisch analysierte Beispiele für die Gültigkeit der Hypothese dar, daß die Artbarriere durch den Ablauf von Genmutationen überschritten werden kann, daß also die ersten Schritte einer phylogenetischen Weiterentwicklung auf diesem Wege möglich sind. Von den sechs aufgeführten Mutanten sind nur die Nummern 40 und 440D fertil. Die Geschlechtsorgane der Blütenmutante Nr. 142A sind zwar funktionsfähig, es unterbleibt jedoch die Befruchtung. Die Mutanten Nr. 10B und 158 schließlich sind steril, während der Genotypus Nr. 60A der Gruppe der Letalmutanten zuzuordnen ist. Für die Weitergabe der mutierten Merkmale unter natürlichen Selektionsbedingungen kommen somit nur die erstgenannten beiden Formen in Betracht, die jedoch gegenüber der Ausgangsform unter den bei uns gegebenen Selektionsbedingungen wegen ihrer verminderten Fertilität mit einem Selektionsnachteil behaftet sind.

Man könnte bei der Beurteilung der vorliegenden Befunde argumentieren, daß sie für die Diskussion der angeschnittenen phylogenetischen Fragestellung aus diesen Gründen nicht beweiskräftig seien. Die Fertilitätsverhältnisse neu auftretender Genotypen sind jedoch meines Erachtens in diesem Zusammenhang von sekundärem Interesse. Die primäre Frage besteht zunächst darin, ob eine Veränderung der Organisationsmerkmale eines Organismus als Folge einer einzigen Genmutation prinzipiell möglich ist. Diese Frage kann positiv beantwortet werden, so daß sich unsere Befunde ergänzend an die Ergebnisse von Stubbe und v. Wettstein (1941) sowie Kappert (1955) anschließen. Außerdem konnte vereinzelt nachgewiesen werden, daß Mutanten mit negativem Selektionswert unter veränderten klimatischen Bedingungen gegenüber

ihrer Ausgangsform durchaus einen Selektionsvorteil aufweisen können. Dies gilt etwa für die „late-tall"-Mutante von *Hordeum* (GUSTAFSSON 1954), ferner für eine frühblühende Mutante unseres eigenen Materials. Zum anderen ist der mit der Anwesenheit mutierter Gene im Organismus häufig verbundene Fertilitätsabfall oft von der genotypischen Gesamtkonstitution des Organismus abhängig. Als Beispiel hierfür sei die in der unten angeführten Zusammenstellung erwähnte Mutante Nr. 444 genannt. Sie zeigt in unserem Material eine starke Fertilitätsminderung, deren Folge eine so geringe Fertilität ist, daß der Genotypus nur in Verbindung mit Spaltungen aus heterozygoten Individuen erhalten und vermehrt werden kann. Die gleiche Mutante ist in experimentellen Mutationsversuchen von WELLENSIEK (1959) aufgetreten und besitzt dort eine so gute Fertilität, daß sie über Samen ohne Schwierigkeiten vermehrt werden kann. Die spezifische Wirkung des mutierten Gens ist also im genetischen Milieu der von uns verwendeten „Dippes gelben Viktoria-Erbse" mit ganz anderen Nebenerscheinungen verbunden als im Milieu der von WELLENSIEK verwendeten Sorte „Dominant". Schließlich ist noch die Anwesenheit polymerer Gene zu berücksichtigen. Wenn wir diesen Begriff in Zusammenhang mit der pleiotropen Wirkung der mutierten Gene anwenden, so ist vereinzelt mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die gleiche Anomalie in einer sterilen und einer fertilen Mutante auftritt. Ein derartiger Fall konnte für die beiden schmalblättrigen Mutationstypen Nr. 176A und 180A unseres Materials nachgewiesen werden. In der von der Ausgangsform abweichenden Blattgestaltung stimmen die beiden Genotypen nahezu überein; während aber die erstgenannte Form fertil ist, zeigt die Mutante Nr. 180A aus noch nicht geklärten Gründen völlige Sterilität. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei anderen Mutationstypen unseres Materials vor.

Bei der Beurteilung der Beziehungen zwischen dem Mutationsgeschehen und der Evolution muß die Tatsache berücksichtigt werden, daß wir selbst bei den genetisch sehr gründlich bearbeiteten pflanzlichen Objekten nur einen kleinen Teil des wirklich vorhandenen Genmaterials kennen. Dies dürfte in besonderem Maße für die Gruppe derjenigen Erbanlagen gelten, die für den Sektor der Blütengestaltung verantwortlich sind, denn der weitaus größte Teil der bisher bekannten Mutationstypen gehört den Klassen der Letal- und Chlorophyllmutanten an. Es ist also durchaus denkbar, daß im Genom von *Pisum sativum* bisher nicht bekannte recessive Gene vorhanden sind, die in ihrer Wirkung den im empirischen Teil behandelten sterilen Mutationstypen entsprechen, ohne daß mit dieser Wirkung Sterilität verbunden ist. Als Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme sei auf die Blütenstruktur der bisher noch nicht erwähnten Mutante Nr. 440A verwiesen. Die Staubblätter der Blüten dieses Genotypus sind nur in der Basalzone in einer Länge von

2—3 mm verwachsen, während der Vergleichswert der Normalform bei 8,5—9 mm liegt. Die Mutante nähert sich also hinsichtlich dieses Merkmals stark der *sterilen* Mutante Nr. 158 mit völlig freien Staubblättern, ist selbst jedoch in geringem Maße *fertil*.

Wenn wir aus den fertilen Mutationstypen unseres Materials diejenigen Formen auswählen, die sowohl in der Blütengestaltung als auch hinsichtlich ihrer habituellen Eigenarten besonders stark von der Normalform abweichen, so wäre es durch Kombination der mutierten Gene möglich, homozygote Linien aufzubauen, die in höchst charakteristischer Weise von der normalen Erbse abweichen. Durch eine Summierung von Markierungsgenen sind derartige Linien für Koppelungsstudien von großem Wert. Eine derartige von uns angestrebte Linie würde im Vergleich zur Ausgangsform etwa folgende Merkmale aufweisen:

Normale Erbse:	*Linie mit mutierten Genen:*
Normaler Blütenbau	Typisches Schiffchen fehlt, dafür jeder Flügel mit dem benachbarten unteren Blütenblatt verwachsen (von Mutante Nr. 40)
Corolle wird nach der Befruchtung abgeworfen	Persistierende Corolle (von Mutante 440 D)
Weiße Blütenfarbe	Gelblich-grünliche Blütenfarbe (von Mutante Nr. 112 A oder 189)
Keine oder stark reduzierte Vorblätter	Sehr große Vorblätter (von Mutante Nr. 40)
Blätter mit Fiedern und Ranken	Ranken zu Fiedern umgebildet („Acacia-Mutante")
Fiedern und Nebenblätter mit normalem Längen-Breiten-Index	Schmale Fiedern und Nebenblätter (von Mutante Nr. 122)
Große Nebenblätter	Untere Blätter ohne Stipeln, die höher inserierten Blätter mit stark reduzierten, lang gestielten, löffelartigen Nebenblättern (von Mutante Nr. 444).

Die eben erwähnte „Acacia-Mutante" ist von VILMORIN (1910), MEUNISSIER (1922), SVERDRUP (1927) und NILSSON (1932) bearbeitet worden und ist in allen Erbsen-Sortimenten vorhanden. Sie ist außerdem in experimentellen Mutationsversuchen von LAMPRECHT (1957) und WELLENSIEK (1959, 1960) erneut aufgetreten. Die in der Gestaltung ihrer Nebenblätter abweichende Mutante Nr. 444 ist gleichzeitig bei WELLENSIEK (1959) als „spoon-leaf-Mutante" nach Neutronen- und bei uns nach Röntgenbestrahlung aufgetreten. Sie zeigt zwar gewisse Blütenanomalien, die jedoch nicht als Veränderung von Organisationsmerkmalen aufzufassen sind, wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht näher behandelt. Das Entsprechende gilt für die Mutanten Nr. 112 A und 189.

Die Individuen einer derartigen Linie sind zwar noch immer Erbsen, sie besitzen jedoch eine Reihe von Merkmalen, die teils für andere Gattungen der Leguminosen charakteristisch sind, teils in der vorliegenden Form in der Familie überhaupt noch nicht bekannt sind. Diese

Linie würde also in systematischer Beziehung schon im Grenzbereich der Species *Pisum sativum* liegen. Würde man sie neuen Mutationsexperimenten aussetzen, so wären bei einem genügend großen Umfang derartiger Versuche zweifellos Formen zu erwarten, die sich im Hinblick auf ihre Gestaltungs- und Organisationsmerkmale noch weiter von den Ausgangsmerkmalen der Species *Pisum sativum* entfernen und schließlich die Artbarriere überschreiten.

Die Frage, ob es sich bei einigen der beschriebenen Formen um den Ablauf von „Großmutationen" im Sinne von STUBBE und v. WETTSTEIN (1941) handelt, läßt sich schon deshalb nicht exakt beantworten, als eine scharfe Grenze zwischen Klein- und Großmutationen nicht gezogen werden kann. Ohne Zweifel weisen die analysierten Mutationstypen nicht so einschneidende Veränderungen auf wie etwa die von STUBBE und v. WETTSTEIN beschriebene *Hirzina*-Mutante von *Antirrhinum*. Andererseits verfügen wir über Blütenmutanten, die sich morphologisch in weit höherem Maße von der Ausgangsform unterscheiden als die behandelten Genotypen, deren Anomalien aber im Rahmen des üblichen Grundbauplans der *Pisum*-Blüte bleiben und daher phylogenetisch weniger von Interesse sind. Dies gilt z. B. für die extrem abweichenden Blüten der Mutante Nr. 192 (GOTTSCHALK 1960). In ihnen wird anstelle der Corolle ein zweiter Kelchblatt-, anstelle des Androeceums ein zweiter Fruchtblattkreis gebildet. Die Ursache dieser Anomalie ist offenbar in einer hormonalen Disharmonie des Ausdifferenzierungsprozesses der zur Blütenbildung prädestinierten Vegetationskegel zu suchen. Derartige Befunde gestatten meines Erachtens keine Rückschlüsse auf bestimmte phylogenetische Vorgänge, denn sie treten ohne Rücksicht auf die taxonomische Stellung einer Species an ganz verschiedenen Stellen des pflanzlichen Systems auf. So fand SIRKS (1924) und vor ihm bereits DE CANDOLLE (1824) bei *Cheiranthus cheiri* eine „gynanthere" Mutante, die der eben erwähnten *Pisum*-Mutante in allen Einzelheiten entspricht. Auch für andere Species sind vereinzelt genetisch fixierte Blütenanomalien beschrieben worden, die dieser Gruppe zuzuordnen sind.

Zusammenfassung

Es werden fünf röntgeninduzierte Mutanten von *Pisum sativum* beschrieben, die im Blütenbau Merkmale aufweisen, die entweder für andere Gattungen bzw. Stämme der Leguminosen charakteristisch oder in den bisher bearbeiteten Genera der Familie überhaupt noch nicht vorhanden sind. Eine sechste Mutante zeigt im Aufbau ihres Sproßsystems Anomalien, die in phylogenetischer Beziehung von Interesse sind. Die Mutanten können als neue Beispiele für die Gültigkeit der Hypothese aufgefaßt werden, daß phylogenetisch bedeutsame Verände-

rungen durch einen einzigen Mutationsschritt herbeigeführt werden können.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Literatur

Burgeff, H.: Konstruktive Mutationen bei *Marchantia*. Naturwissenschaften **29**, 289—299 (1941a).

— Konstruktive Mutationen bei der Lebermoos-Gattung *Marchantia*. Biol. Zbl. **61**, 337—360 (1941b).

Candolle, A. de: Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis, vol. I. 1824.

Engler, A., u. K. Prantl: Die natürlichen Pflanzenfamilien, III. Teil, 3. Abt., S. 70—388 Leipzig 1894.

Gelin, O., L. Ehrenberg and S. Blixt: Quantitative studies of induced mutations in peas II. Mutagenic effect of oxygen. Agri hort. genet. (Landskrona) **17**, 265—274 (1959).

Gottschalk, W.: Über die genetischen Verhältnisse einer Komplex-Mutante von *Vicia faba*. Angew. Bot. **32**, 147—152 (1958).

— Über strahlenbedingte erbliche Sterilitätserscheinungen bei pflanzlichen Versuchsobjekten. Atompraxis **6**, 341—347 (1960).

— Die Wirkung mutierter Gene auf die Morphologie und Funktion pflanzlicher Organe. Bot. Studien (1961, in Vorbereitung).

—, u. A. Scheibe: Untersuchungen an strahleninduzierten Mutanten von *Pisum sativum*. Z. Pflanzenzüchtung **42**, 313—338 (1960).

Gustafsson, A.: Mutations, viability and population structure. Acta agric. scand. **4**, 601—632 (1954).

—, u. D. v. Wettstein: Mutationen und Mutationszüchtung. In Roemer-Rudorfs Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl., Bd. I, S. 612—699. 1956/57.

Hegi, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. IV, Teil 3. München 1935.

Kappert, H.: Einige für Evolutionsfragen interessante Mutationen bei *Matthiola*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **68**, 413—422 (1955).

Lamprecht, H.: Die genisch-plasmatische Grundlage der Artbarriere. Agri hort. genet. (Landskrona) **2**, 75—142 (1944).

— Durch Komplexmutation bedingte Sterilität und ihre Vererbung. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. Erg.-Bd. **20**, 126—141 (1945).

— New and hitherto known polymeric genes of *Pisum*. Agri hort. genet. (Landskrona) **11**, 40—54 (1953a).

— Bisher bekannte und neue Gene für die Morphologie der *Pisum*-Blüte. Agri hort. genet. (Landskrona) **11**, 122—132 (1953b).

— Neues Auftreten der Mutation im interspezifischen Gen *lac* von *Pisum*. Agri hort. genet. (Landskrona) **14**, 177—184 (1956a).

— Die Koppelung des interspezifischen Gens *lac* von *Pisum*. Agri hort. genet. (Landskrona) **14**, 185—194 (1956b).

— Durch Röntgenbestrahlung von *Pisum*-Samen erhaltene neue und bekannte Genmutationen. Agric. hort. genet. (Landskrona) **15**, 142—154 (1957).

— Über grundlegende Gene für die Gestaltung höherer Pflanzen sowie über neue und bekannte Röntgenmutanten. Agri hort. genet. (Landskrona) **16**, 145—195 (1958).

— Der Artbegriff. Agri hort. genet. (Landskrona) **17**, 105—264 (1959).

—, u. H. Mrkos: Die Vererbung des Vorblattes bei *Pisum* sowie die Koppelung des Gens *Br*. Agri hort. genet. (Landskrona) **8**, 153—162 (1950).

Meunissier, A.: Observations sur l'hérédité du caractère «Pois à trois cosses» et du caractère «Pois chenille». Genetica **4**, 279—320 (1922).
Nilsson, E.: Erblichkeitsversuche mit *Pisum*, III—V. Hereditas (Lund) **17**, 71—99 (1932).
Nybom, N.: Mutation types in barley. Acta agric. scand. **4**, 430—456 (1954).
Rudorf, W.: Über die mutagene Wirkung von S^{35} bei *Phaseolus vulgaris*. Z. Pflanzenzüchtung **45**, 69—90 (1961).
Sandt, W.: Zur Kenntnis der Beiknospen. Bot. Abhandlungen, Heft 7. Jena 1925.
Scheibe, A., u. W. Gottschalk: Morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an einer Blatt- und Blütenmutante von *Vicia faba*. Angew. Bot. **30**, 14—44 (1956).
Schmidt, H.: Teratologische Beobachtungen an einigen einheimischen Pflanzen. Beih. bot. Zbl. **28**(II), 301—328 (1911).
Sirks, M. J.: Die gynanthere Form des Goldlacks und ihre Vererbung. Genetica **6**, 537—548 (1924).
Stubbe, H.: Über einige theoretische und praktische Fragen der Mutationsforschung. Abh. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-nat. Kl. **47**, 1—48 (1952).
—, u. F. v. Wettstein: Über die Bedeutung von Klein- und Großmutationen in der Evolution. Biol. Zbl. **61**, 265—297 (1941).
Sverdrup, A.: Linkage and independent inheritance in *Pisum sativum*. J. Genet. **17**, 221—251 (1927).
Vilmorin, Ph. de: Recherches sur l'hérédité mendélienne. C.R. Acad. Sci. (Paris) **2**, 548—551 (1910).
Wellensiek, S. J.: Neutronic mutations in peas. Euphytica **8**, 209—215 (1959).
— Mutagenic genes. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **63**, 38—42 (1960).

Prof. Dr. W. Gottschalk,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn,
Meckenheimer Allee 176

Planta 57, 331—338 (1961)

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn

DAS WACHSTUM DER *JUNIPERUS COMMUNIS*-GEWEBEKULTUREN IN GEGENWART VERSCHIEDENER KOHLENHYDRATE, INSBESONDERE VON STÄRKE

Von

FRIEDRICH CONSTABEL

(Eingegangen am 28. Juli 1961)

Seit mehreren Jahren kultivieren wir einen normalen, auxinheterotrophen und daneben einen auxinautotrophen Gewebestamm von *Juniperus communis*. Die auxinautotrophen Gewebe lassen sich auf Nährböden mit löslicher Stärke als Kohlenhydratquelle züchten (CONSTABEL 1960). Gewebewachstum in Gegenwart von Stärke wurde bisher nur bei sehr wenigen und zwar vorwiegend auxinautotrophen Gewebekulturen (Tumorgewebekulturen) beobachtet (HILDEBRANDT u. RIKER 1949, NICKELL u. BURKHOLDER 1950, STRAUS u. LARUE 1954). Es ist auf eine extracelluläre Amylaseaktivität zurückzuführen (BRAKKE u. NICKELL 1955).

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, in welchem Maße auch die normalen *Juniperus communis*-Kulturen Stärke als Kohlenhydratquelle verwerten können. Zum Vergleich wird der Einfluß einiger anderer Kohlenhydrate auf das Gewebewachstum untersucht. Die Größe der extracellulären Amylaseaktivität soll durch Nährbodenanalysen bestimmt werden.

Methodik

Der Nährboden für den normalen *Juniperus communis*-Gewebestamm hatte folgende Zusammensetzung:

Wasser	1000 ml	Aneurin	0,0001 g
Agar	11 g	Lactoflavin	0,0001 g
Mineralsalzlösung nach HELLER (1953)		Ca-Pantothenat	0,01 g
		Folsäure	0,001 g
Glucose	30 g	Nicotinsäure	0,0005 g
Indolyl-3-essigsäure	0,001 g	Biotin	0,0001 g
Asparagin	0,02 g	Cholinchlorid	0,01 g
Meso-Inosit	0,1 g	p_H-Wert 5,2	

Je 50 ml dieses Nährmediums wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kolben abgefüllt und anschließend 2×20 min lang im Dampftopf sterilisiert. Jeder Kolben wurde mit einem Impfstück, Frischgewicht $0{,}12 \pm 0{,}02$ g, beschickt. Die Kolbenöffnungen wurden zur Hemmung der Verdunstung und zur Vermeidung von Infektionen mit einer Aluminiumfolie überdeckt. Die Gewebe wuchsen in jedem Versuch 50 Tage bei 24° C und 14 Std/Tag Licht.

Herstellung der Nährböden mit Stärkehydrolysaten: Es wurden zunächst Nährlösungen mit 3% löslicher Stärke oder Kartoffelstärke ohne Agar im Dampftopf erhitzt. Nach Abkühlung wurden 120 mg Diastase/1 Liter Nährlösung hinzugefügt und die Kolben 24 Std lang bei 30° C gehalten. Endlich wurden die Lösungen mit Agar versehen, bei löslicher Stärke 1,1%, bei Kartoffelstärke 0,6% und sterilisiert.

Bei Versuchsende wurden das Frischgewicht, das Trockengewicht und der Gesamtstickstoff der Gewebe (Mikro-Kjeldahl-Methode) bestimmt. Außerdem wurde der von Gewebebrocken sorgfältig gereinigte Nährboden — die feste Gewebemasse ließ sich vom Substrat gut abheben — mit einem Spatel zerquetscht, sodann mit sterilem Wassser zu 70 ml aufgefüllt und nach 12 Std filtriert. Das Filtrat diente zur quantitativen Bestimmung des Zuckergehaltes nach der Bertrand-Methode (PRINGSHEIM 1932).

Alle Versuche liefen in Reihen von 20 Parallelen. Die Versuchsreihen wurden wiederholt.

Vorversuch

Die Verwertung von Stärke als Kohlenhydratquelle ist vor allem bei auxinautotrophen Gewebekulturen, Tumorgeweben, festgestellt worden. Es war daher notwendig, in einem Vorversuch noch einmal die Auxinheterotrophie unseres Versuchsmaterials zu überprüfen.

In drei aufeinanderfolgenden Passagen wuchsen auxinheterotrophe und -autotrophe *Juniperus*-Kulturen auf der gleichen, einmal gewählten Indolyl-3-essigsäure (IES)-konzentration. Es ergab sich dabei (Tabelle 1) ein Konzentrationsoptimum für die normalen Gewebe von 10^{-6} g/ml IES.

Tabelle 1. *Abhängigkeit des Wachstums der Juniperus communis-Gewebestämme von der IES-Konzentration.* (k. W. = kein Wachstum. Mittelwerte von je 20 Kulturen.)

Gewebekulturen	Auxinheterotroph					Auxinautotroph
IES-Konz.	5×10^{-6} g/ml	10^{-6} g/ml	10^{-7} g/ml	10^{-8} g/ml	0	0
Frischgewicht (g) am Ende der						
1. Passage .	1,5	2,0	0,8	0,6	0,5	3,5
2. Passage .	1,1	1,9	0,8	0,8	k. W.	4,4
3. Passage .	$0,9\pm0,3$	$1,9\pm0,5$	$0,8\pm0,4$	$0,7\pm0,4$	k. W.	$3,8\pm1,1$

Eine höhere Konzentration scheint das Wachstum bereits zu hemmen, ein Nährboden ohne Auxinzusatz führt bei diesen Kulturen schon in der zweiten Passage zum Wachstumsstillstand. Die auxinautotrophen Gewebe gedeihen auf auxinfreien Nährböden sehr gut.

Die Versuche und ihre Ergebnisse

1. Wachstumsmessungen

Zunächst wurde der Einfluß von sieben verschiedenen Kohlenhydraten und zweierlei Stärkehydrolysaten auf das Gewebewachstum untersucht. Das Ergebnis (Tabelle 2) zeigt, daß alle Substanzen außer Inulin

ein gutes Gewebewachstum ermöglichen. Die geringen Unterschiede und relativ großen Streuungen der Werte lassen die Aufstellung einer Reihenfolge der Kohlenhydrate nach steigender Wachstumsförderung nicht zu. Gemessen am Frischgewicht erreicht das Wachstum auf Stärkenährböden 58% des Wachstums auf Glucosenährböden. Der Unterschied ist bei Anwendung des t-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% signifikant. Stärke und Stärkehydrolysate haben etwa den gleichen Einfluß auf das Wachstum.

Tabelle 2. *Einfluß verschiedener Kohlenhydrate auf das Wachstum der normalen Juniperus communis-Gewebekulturen.* (Mittelwerte von je 40 Kulturen. n. b. = nicht bestimmt.)

Kohlenhydrat im Nährboden 3 %	Frischgewicht g	Trockengewicht g	N-Gehalt mg
Glucose	1,9 ± 0,5	0,10	1,4
Fructose	1,3 ± 0,4	0,07	1,1
Maltose	1,6 ± 0,5	0,08	1,2
Saccharose	1,5 ± 0,5	0,08	1,1
Lösliche Stärke . .	1,1 ± 0,3	0,06	0,8
Desgl. hydrolysiert	1,0 ± 0,3	0,04	0,7
Kartoffelstärke . .	1,1 ± 0,3	0,05	0,8
Desgl. hydrolysiert	1,2 ± 0,4	0,06	0,9
Inulin	0,4 ± 0,2	n. b.	n. b.

Für den Unterhalt der *Juniperus*-Kulturen scheint Glucose eine gute Kohlenhydratquelle zu sein.

Tabelle 3 gibt das Ergebnis einer langdauernden Kultur der Gewebe mit löslicher Stärke als Kohlenhydratquelle wieder. Die Mittelwerte der Meßreihen weichen am Ende der dritten Passage nicht wesentlich von den entsprechenden Werten der Tabelle 2 ab. Dieser Versuch beweist zugleich, daß die Ergebnisse einer ersten Passage bereits gültig sind.

Die Variation der Kohlenhydratkonzentration im Nährboden von 2—8% (Tabelle 4) hat im Fall der Glucose einen erheblichen Einfluß auf das Wachstum, bei löslicher Stärke ist die Reaktion der Gewebe unbedeutend. Nach dem t-Test ergibt sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2% ein Wachstumsmaximum der Gewebe durch Zusatz von 4% Glucose zum Nährboden. Bei 8% Glucose wuchsen die Kulturen am schwächsten; sie waren am Ende der Passage auch bereits zu einem großen Teil nekrotisiert. Darauf ist der sehr hohe Wert der Trockensubstanz zurückzuführen. Im Gegensatz zur Glucose kann die Stärkekonzentration im Nährboden ohne schädliche Folgen für die Gewebe auf 8% gesteigert werden.

Tabelle 3. *Das Wachstum der normalen Juniperus communis-Gewebekulturen in Gegenwart von 3% löslicher Stärke in drei aufeinanderfolgenden Passagen.* (Mittelwerte von je 20 Kulturen.)

Passage	Frischgewicht g	Trockengewicht g	N-Gehalt mg
1	1,2	n. b.	n. b.
2	1,1	n. b.	n. b.
3	1,0	0,06	0,8

Tabelle 4. *Abhängigkeit des Wachstums der normalen Juniperus communis-Gewebekulturen von der Kohlenhydratkonzentration.* (Mittelwerte von je 20 Kulturen.)

Kohlenhydrat	Glucose			Lösliche Stärke		
Konzentration	2 %	4 %	8 %	2 %	4 %	8 %
Frischgewicht (g)	1,6 ± 0,5	2,6 ± 0,7	0,9 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,3
Trockengewicht (g) . .	0,09	0,14	0,09	0,06	0,06	0,05
Trockensubstanz (%) .	5,6	5,3	10,0	5,0	5,5	5,6
N-Gehalt (mg) .	1,4	2,2	1,2	0,8	0,9	0,9

Cocosnußmilch stimuliert das Wachstum der *Juniperus*-Kulturen beträchtlich. Inwieweit dies auch für Gewebe auf stärkehaltigen Nährböden zutrifft, wird in Tabelle 5 dargestellt. In den beiden Versuchsreihen mit Glucose und löslicher Stärke ist ein Einfluß von Cocosnußmilch auf das Gewebewachstum vorhanden. Bereits ein Zusatz von 10% hat eine signifikante Steigerung des Frischgewichtes zur Folge. In Gegenwart von Stärke ist die Frischgewichtszunahme allerdings zur Hauptsache auf eine Gewebevergrößerung unter Wasseraufnahme zurückzuführen. Nur auf Glucosenährböden bewirkt die Cocosnußmilch auch eine wesentliche Steigerung des Trockengewichtes und des N-Gehaltes.

Bei der Verwendung von Cocosnußmilch ist zu berücksichtigen, daß jedem Nährboden 0,16% lösliche Zucker zugefügt werden. (Mittelwert aus 5 Proben der in diesen Versuchen verwendeten, unreifen Cocosnüsse nach Inversion des Saccharoseanteils).

Tabelle 5. *Einfluß von Cocosnußmilch auf das Wachstum der normalen Juniperus communis-Gewebekulturen.* (Mittelwerte von je 20 Kulturen.)

Kohlenhydrat im Nährboden 3 %	Cocosm.-zusatz %	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Trockensubstanz %	N-Gehalt mg
Glucose . . .	—	1,7 ± 0,4	0,10	5,9	1,4
Glucose . . .	10	3,1 ± 0,8	0,17	5,5	2,5
Glucose . . .	20	4,8 ± 1,2	0,26	5,4	3,9
Lösliche Stärke	—	1,0 ± 0,3	0,06	6,0	0,9
Lösliche Stärke	10	2,2 ± 0,5	0,07	3,2	1,1
Lösliche Stärke	20	2,6 ± 0,6	0,09	3,5	1,4

2. Nährbodenanalysen

An die Bestimmung des Gewebewachstums in Gegenwart verschiedener Kohlenhydratquellen, insbesondere Stärke, wurde eine Analyse des Kohlenhydratverbrauches angeschlossen. Im Hinblick auf die relativ geringen Unterschiede des Gewebewachstums auf Nährböden mit Glucose, Fructose, Maltose und Saccharose überrascht nicht, daß die Werte für den Verbrauch dieser Zucker (Tabelle 6) nicht wesentlich

voneinander abweichen. Der Nutzeffekt der Kohlenhydrate ist, wie der ökonomische Koeffizient (g Trockensubstanz × 100/g verbrauchter Zucker; PFEFFER 1897) zeigt, bei Gewebekulturen recht gut.

Tabelle 6. *Zuckerverbrauch der normalen Juniperus communis-Gewebekulturen in einer Passage von 50 Tagen.* (Mittelwerte von je 40 Kulturen.)

Kohlenhydrat im Nährboden 3 %	Verbrauch g	Ökonomischer Koeffizient	g Zuckerverbrauch / mg N des Gewebes
Glucose	0,22 ± 0,08	45,4	0,16
Fructose	0,18 ± 0,07	38,8	0,16
Maltose	0,12 ± 0,05	66,6	0,10
Saccharose als Invertzucker . .	0,19 ± 0,10	42,1	0,17

Schon früher konnte im Substrat der *Juniperus*-Kulturen eine Hydrolyse der Stärke beobachtet werden. Durch eine Bestimmung des Reductosengehaltes im stärkehaltigen Nährboden am Ende einer Gewebepassage sollte nun ein Anhalt für die Größe der extracellulären Amylaseaktivität gewonnen werden. Das Ergebnis wird in Tabelle 7 dargestellt. Etwa $^1/_4$ der Stärkemenge des Nährbodens wurde im Laufe einer Gewebepassage gespalten. Dieses Verhältnis wird durch die Anwesenheit von Cocosnußmilch im Nährboden nicht wesentlich beeinflußt. Dies bedeutet, daß eher der Stickstoffgehalt der Gewebe als deren Frischgewicht zur Größe der Amylaseaktivität in Beziehung gesetzt werden kann. In den Saccharosenährböden konnte nach der Gewebepassage eine große Menge Invertzucker nachgewiesen werden, so daß auf eine hohe Invertaseaktivität geschlossen werden muß. Inulinase konnte bei den Inulinkulturen nicht gefunden werden. Geringe Fructosemengen waren auch in nicht beimpften Nährböden vorhanden.

Tabelle 7. *Extracelluläre Reductosenproduktion durch normale Juniperus communis-Gewebekulturen während einer Kulturdauer von 50 Tagen.* (Mittelwerte von je 40 Kulturen.)

Kohlenhydrat im Nährboden 3 %	Cocosm.-zusatz %	Reductosen im Nährb. bei Passagenbeginn g	Reductosenproduktion / Nährboden g	Bezugssubstanz	g Reductosen / mg N des Gewebes
Lösliche Stärke	—	0,02	0,37 ± 0,08	Maltose	0,41
Lösliche Stärke	10	0,05	0,40 ± 0,11	Maltose	0,36
Inulin	—	0,02	—	Fructose	—
Saccharose . .	—	0,04	1,05 ± 0,15	Invertzucker	0,95

Um ein richtiges Maß für die Amylase- und Invertaseaktivität zu erhalten, müssen den durch die Analyse des Nährbodens gefundenen Reductosemengen noch die von dem Gewebe während der Kultur verbrauchten Zuckermengen zugerechnet werden. Die Addition der Daten

in Tabelle 6 und 7 ergibt dann, daß in 50 Tagen pro mg Stickstoff der Gewebe 0,5 g Maltose bzw. 1,1 g Invertzucker enzymatisch gespalten wurden.

Diskussion

Nur in wenigen Fällen konnte bisher bei höheren Pflanzen eine extracelluläre Aktivität von Carbohydrasen beobachtet werden (DORMER u. STREET 1949, BRAKKE u. NICKELL 1955). Die Hydrolyse von Stärke und auch Saccharose im Nährboden während einer Passage von *Juniperus communis*-Gewebekulturen lassen auf eine Aktivität von Amylase und Invertase schließen. Bevor aber weitere Untersuchungen zur Lokalisation des Reaktionsortes und zur Mengenbestimmung der Enzyme unternommen werden, sollte zunächst das Wachstum unserer Gewebestämme in Gegenwart verschiedener Kohlenhydrate, insbesondere von Stärke, bestimmt und ein Anhalt für die Größe der Enzymaktivitäten gewonnen werden.

Bei zahlreichen Gewebekulturstämmen wurde bereits der Einfluß verschiedener Kohlenhydrate auf das Wachstum untersucht. Auf stärkehaltigen Nährböden gediehen lediglich Crowngall-Gewebe von *Vinca rosea* und *Tagetes erecta* sowie Tumorgewebe des Hybriden *Nicotiana langsdorfii* x *N. glauca* (HILDEBRANDT u. RIKER 1949), Virustumorgewebe von *Rumex acetosa* (NICKELL u. BURKHOLDER 1950) und Maisendospermgewebe (STRAUS u. LARUE 1954). Durch die zuletzt genannten Autoren wurde bewiesen, daß nicht nur tumorartige Gewebe Stärke verwerten können.

Der Unterschied zwischen dem Einfluß von Glucose und Stärke auf das Gewebewachstum konnte nur schwach gesichert werden. Das Frischgewicht der Gewebe auf Stärkenährböden erreichte bei Versuchsende 58% des Frischgewichtes der Kulturen auf Glucosenährböden. Bei unseren auxinautotrophen Geweben hatte sich ein Verhältnis von 71% ergeben. BRAKKE u. NICKELL (1955) erzielten mit dem Virustumorgewebe von *Rumex acetosa* einen Wert von 73%. Im Vergleich zu den raschwüchsigen auxinautotrophen *Juniperus*-Kulturen erschien die Fähigkeit der normalen Gewebe, in Gegenwart von Stärke zu gedeihen, anfangs zweifelhaft (CONSTABEL 1960). Der erfolgreiche Versuch einer langdauernden Kultur mit Stärke als einziger Kohlenhydratquelle hat diese Unsicherheit beseitigt. Entgegen den Beobachtungen von STRAUS u. LARUE (1954) und BRAKKE u. NICKELL (1955) konnte mit einer Erhöhung der Stärkekonzentration keine Wachstumssteigerung erzielt werden.

Saccharose oder Glucose werden als Kohlenhydratquelle für Gewebekulturen bevorzugt (GAUTHERET 1959). Auch wir werden dem Standardnährboden weiterhin Glucose zusetzen.

Slabecka-Sweykowska (1952) und Piechowski (1958) berichten, daß die Wirkung dieser Zucker durch enzymatisch produzierte Stärkehydrolysate übertroffen werden kann. Die Reproduktion dieser Versuche führte mit unserem Material jedoch zu keinem entsprechenden Ergebnis.

Analysen des Kohlenhydratverbrauches von Gewebekulturen auf festen Nährmedien wurden in der Literatur bisher nicht gefunden. Die von uns benutzte Methode lieferte gut reproduzierbare Werte. Den Kohlenhydratverbrauch von Organkulturen in Nährlösungen untersuchten Burström (1941) bei Weizenwurzeln und Dormer u. Street (1949) bei Tomatenwurzeln. Danach ist der ökonomische Koeffizient von Glucose, Fructose und Saccharose bei Organkulturen (Weizenwurzeln) und unseren Gewebekulturen etwa gleich, Maltose scheint von den Geweben besser verwertet zu werden. Die genannten Autoren entdeckten ebenfalls eine starke Hydrolyse der Saccharose. Während jedoch Burström sie für nicht enzymatisch hält, gelang es Dormer u. Street, die Aktivität von Invertase an der Zelloberfläche der Wurzeln nachzuweisen. Amylase wird in das Substrat sezerniert; sie konnte aus der Nährlösung isoliert werden (Brakke u. Nickell 1955). In den eigenen Versuchen wurde die Aktivität von Invertase und Amylase näherungsweise bestimmt. Die Ergebnisse rechtfertigen weitere Untersuchungen.

Zusammenfassung

1. Normale, auxinheterotrophe *Juniperus communis*-Gewebekulturen wachsen auf Nährböden mit Stärke als einziger Kohlenhydratquelle. Das Gewebewachstum ist bei Stärke gegenüber Glucose etwa um die Hälfte vermindert.

2. Glucose, Fructose, Maltose und Saccharose zeigen keine signifikanten Wirkungsunterschiede auf das Wachstum.

3. Stärkehydrolysate fördern das Gewebewachstum im gleichen Maße wie unangegriffene Stärke.

4. Im Gegensatz zur Glucose ist das Wachstum der Gewebe auf stärkehaltigen Nährböden im Bereich von 2—8% unabhängig von der Kohlenhydratkonzentration.

5. Die Wachstumsstimulation durch Zusatz von Cocosnußmilch kommt auf Stärkenährböden nur schwach zur Wirkung.

6. Es werden der Kohlenhydratverbrauch der Gewebekulturen und der ökonomische Koeffizient der Kohlenhydrate mitgeteilt.

7. Am Ende einer Gewebepassage wurden im saccharosehaltigen Nährboden eine beträchtliche Menge Invertzucker, im stärkehaltigen Nährboden eine große Menge Maltose gefunden. Dies wird mit einer extracellulären Aktivität von Invertase, bzw. Amylase erklärt.

Literatur

Brakke, M. K., and L. G. Nickell: Secretion of an enzyme from intact cells of a higher plant tumor. Ann. Biol. **31**, 215—224 (1955).

Burström, H.: Studies on the carbohydrate nutrition of roots. Ann. agric. Coll. Sweden **9**, 264—284 (1941).

Constabel, F.: Zur Amylasesekretion pflanzlicher Gewebekulturen. Naturwissenschaften **47**, 17—18 (1960).

Dormer, K. J., and H. E. Street: The carbohydrate nutrition of tomato roots. Ann. Botany **13**, 199—217 (1949).

Gautheret, R. J.: La culture des tissus végétaux. Paris: Masson & Cie. 1959.

Heller, R.: Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. nat. Bot. Biol. vég. **14**, 1—223 (1953).

Hildebrandt, A. C., and A. J. Riker: The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue in vitro. Amer. J. Bot. **36**, 74—85 (1949).

Nickell, L. G., and P. R. Burkholder: Atypical growth of plants. II. Growth in vitro of virus tumors of *Rumex* in relation to temperature, pH, and various sources of nitrogen, carbon, and sulfur. Amer. J. Bot. **37**, 538—547 (1950).

Pfeffer, W.: Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. 1: Stoffwechsel. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1897.

Piechowski, M.: The potato starch hydrolyzate as a substrate of carrot tissue grown in vitro. Acta Soc. Bot. Polon. **27**, 373—382 (1958).

Pringsheim, H.: Einfache Kohlehydrate, in G. Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 2/1. Wien: Springer 1932.

Slabecka-Sweykowska, A.: On the conditions of anthocyanin formation in the *Vitis vinifera* tissue cultivated in vitro. Acta Soc. Bot. Polon. **21**, 537—576 (1952).

Straus, J., and C. D. Larue: Maize endosperm tissue grown in vitro. I: Culture requirements. Amer. J. Bot. **41**, 687—694 (1954).

Dr. F. Constabel, Pharmakognostisches Institut der Universität,
Bonn a. Rh., Nußallee 2

Planta 57, 339—353 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

WACHSTUMSINDUKTION UND WUCHSSTOFFMETABOLISMUS IM WEIZENKOLEOPTILZYLINDER

III. Mitteilung

STOFFWECHSELPRODUKTE DER NAPHTHYL-1-ESSIGSÄURE UND 2,4-DICHLORPHENOXYESSIGSÄURE UND DER VERGLEICH MIT JENEN DER INDOL-3-ESSIGSÄURE UND BENZOESÄURE

Von

HANS-DIETER KLÄMBT

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1961)

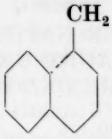
In den vorangegangenen Arbeiten (KLÄMBT 1961a, b) konnte ich eine Anzahl verschiedener Reaktionsprodukte der Indol-3-essigsäure (IES) und Benzoesäure (BS) nachweisen, die nach 4- bzw. 22stündiger Inkubation im Weizenkoleoptilzylinder (WKZ) gebildet werden. Neben der Säure-Amid-Konjugation, wie sie in der Indol-3-acetylasparaginsäure (IAAS) und der Benzoylasparaginsäure (BAS) vorliegt, wurde eine beachtliche Glucose-Veresterung beider aromatischer Säuren nachgewiesen. Zusätzlich konnte für einige Reaktionsprodukte die Esternatur der Säurebindung wahrscheinlich gemacht werden.

Aus der vergleichbaren Lage und Anzahl der Stoffwechselprodukte beider Säuren auf dem Papierchromatogramm konnten zunächst keinerlei Beziehungen der Derivate der IES zur Wachstumsförderung gefunden werden. Aus diesem Grund schien es angebracht, zwei synthetische Streckungswuchsstoffe in die weiteren Untersuchungen einzubeziehen. Dabei fiel die Wahl auf Naphthyl-1-essigsäure (NES), die, wie ZENK (1960) nachweisen konnte, in Erbsenepikotylen zur Naphthyl-1-acetylasparaginsäure (NAAS) konjugiert wird, und auf 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), für die ANDREAE und GOOD (1957) das Asparaginsäure-Derivat (2,4-DAAS) im gleichen Objekt gefunden haben. Dabei handelt es sich also um zwei Wuchsstoffsäuren, für die bereits Stoffwechselprodukte nachgewiesen wurden.

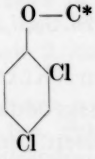
Material und Methoden

Die Anzucht des Weizens — Carsten VI — und die Aufarbeitung der WKZ wurden bereits früher beschrieben (KLÄMBT 1961b). Die papierchromatographische Trennung erfolgte 2-dimensional. In der 1. Dimension Isopropanol: NH_4OH: Wasser (80:15:5) und gelegentlich 80%iges Isopropanol.

Sämtliche Testsubstanzen wurden radioaktiv verwendet. Indol-3-essigsäure war methyl-^{14}C-markiert (CFA 202, Radiochemical Centre, Amersham, England; spezifische Aktivität 3,82 mC/mM), Benzoesäure war carboxyl-^{14}C-markiert (CFA 26, gleiche Herkunft; spezifische Aktivität 2,62 mC/mM). Naphthyl-1-essigsäure wurde in den Versuchen carboxyl-^{14}C-markiert verwendet



(ORN-2, Orlando Research, Orlando, USA; spezifische Aktivität 1,95 mC/mM) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, methyl-^{14}C-markiert



(CFA 27, Radiochemical Centre, Amersham, England; spezifische Aktivität 1,38 mC/mM).

Die Chromatogramme der WKZ nach Inkubation mit diesen radioaktiv markierten Substanzen wurden wie früher über Röntgenpapier entwickelt. Die Expositionszeit betrug zumeist 12 Tage oder ein Vielfaches davon.

Für die Untersuchungen über die Löslichkeit der verschiedenen Stoffwechselprodukte in einigen organischen Lösungsmitteln wurde folgender Extraktionsgang vorgenommen. Während 10 WKZ nach der früher beschriebenen Methode nach 22stündiger Inkubation in 6×10^{-4} m Wuchsstoff- bzw. BS-Lösungen als Vergleichsproben aufgearbeitet wurden, kamen zur Extraktion je 50 WKZ gleicher Inkubation zur Verwendung. Sie wurden mit 30 ml Wasser gebrüht, kurz aufgekocht, anschließend zermörsert und etwa 22 Std wäßrig extrahiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Glaswolle-Filtration wurde mit HCl (etwa p_H 2,8—3,0) und mit der 5fachen Menge peroxydfreien Diäthyläther ausgeschüttelt. Der ätherische Extrakt wurde abgetrennt, eingeengt und punktförmig quantitativ auf Chromatographierpapier aufgetragen. Die wäßrige Phase nach der Ätherextraktion wurde nunmehr mit der 5fachen Menge Äthylacetat extrahiert. Nach Trennung der wäßrigen Phase wurde diese schließlich noch mit der 5fachen Menge n-Butanol ausgeschüttelt und Äthylacetat- und Butanol-Extrakt ganz entsprechend der Aufarbeitung des Ätherextraktes verarbeitet. Anschließend wurde 2-dimensional chromatographiert.

Ergebnisse

NES-Inkubationsversuche. Die Autoradiogramme — Abb. 1 und 2 — der 2-dimensionalen Chromatogramme von je zehn am Startfleck aufgedrückten WKZ, die 22 Std in NES-Lösungen inkubiert waren, zeigen eine ähnliche Fleckenverteilung wie jene nach IES-Inkubationen (KLÄMBT 1961b). Bemerkenswert ist die relativ schwache Aktivität, die für den Glucose-Ester (NGl) und ebenfalls für die Naphthyl-1-acetylasparaginsäure (NAAS) gemessen werden konnte. Offenbar scheint das Derivat X_2 ganz zu fehlen. Zusätzlich tritt aber eine Substanz unterhalb der NES auf (NZ), die — wie alle übrigen Reaktionsprodukte — in ihrer chemischen Natur unbekannt ist. Da sie jedoch augenscheinlich keinen vergleichbaren Fleck unter den unbekannten IES-Stoffwechselprodukten besitzt, dürfte von vornherein eine nähere Beziehung dieser Substanzen zur Wachstumsförderung auszuschließen sein.

Um eine möglichst übersichtliche Kennzeichnung aller erfaßbaren Stoffwechselprodukte zu erreichen, wird der unbekannte Reaktionspartner mit „X" bezeichnet, wenn vergleichbare Reaktionsprodukte sowohl von den Streckungswuchsstoffen als auch von BS gebildet werden. „Y" wird immer dann verwendet, wenn es sich um Reaktionsprodukte handelt, die offenbar von BS nicht oder nur in vergleichbar sehr geringen Mengen gebildet werden und daher einen möglichen Zusammenhang mit der Wachstumsförderung besitzen können.

Da der NX_1-Fleck deutlich mit BX_1 vergleichbar ist, liegt folglich auch im NY_1-Fleck ein „neues" Reaktionsprodukt vor, das — wie später näher gezeigt wird — IX_1 entspricht. IX_1 muß also in IY_1 umbenannt werden. Neben NY_1 wird „NX_5" und „NX_6" in starkem Maße gebildet. In der Deutlichkeit und Konzentration des Auftretens erinnern sie sehr an die Bildung von „IX_5" und „IX_6". Beide Wuchsstoffe verhalten sich dabei untereinander gleich und recht verschieden gegenüber BS, die nur Spuren von BX_5 und BX_6 erkennen läßt. Hier liegt folglich ein bemerkenswerter Unterschied zwischen Wuchsstoff und Nicht-Wuchsstoff vor. Trotzdem sagt er nichts Bestimmtes aus, so lange wir die Reaktionspartner dieser Stoffwechselprodukte nicht kennen.

Um eine bessere Trennung der X_5- und X_6-Derivate zu erhalten, wurde in der zweiten Dimension statt in Isopropanol:NH_4OH:Wasser in 80%igem Isopropanol chromatographiert. Die Abb. 3—5 zeigen die Autoradiogramme dieser chromatographischen Trennungen. Hierdurch wurden „NX_5" und „NX_6" allein in sechs voneinander gut unterscheidbare Flecken getrennt — NY_2 bis NY_7. Die Derivate der IES (Abb. 4) besitzen leider nicht die erforderliche Deutlichkeit, wenngleich auch hier drei Flecken einwandfrei zu erkennen und zu vergleichen sind. Daneben kann hierbei eine Anzahl von Reaktionsprodukten nicht eingeordnet

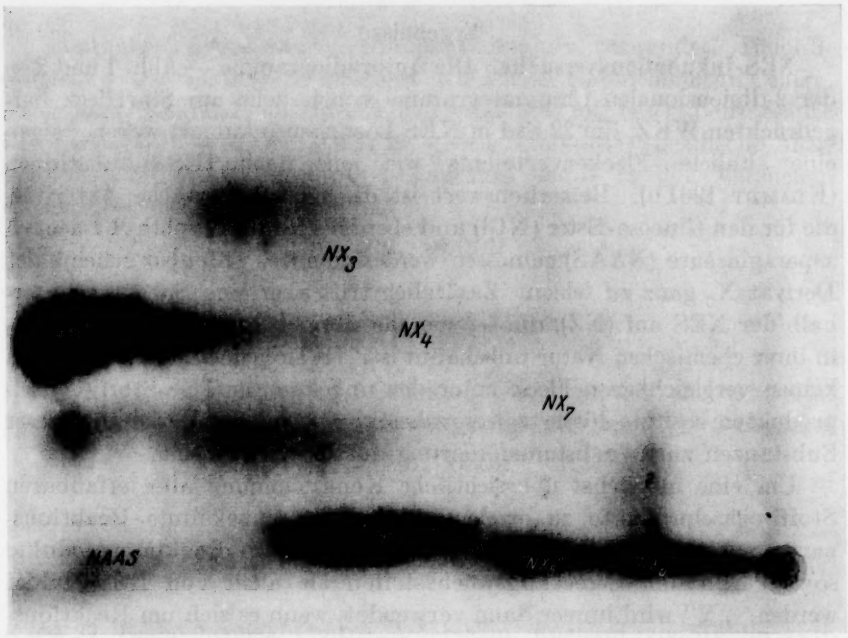


Abb. 1. Autoradiogramm eines 2-dimensionalen Chromatogramms von zehn am Startfleck aufgedrückten WKZ, die 22 Std in 6×10^{-4} m ^{14}C-markierter NES inkubiert waren. 1. Dimension (horizontal): Butanol:Ameisensäure:Wasser, 2. Dimension: Isopropanol: NH_4OH:Wasser. *S* Startfleck

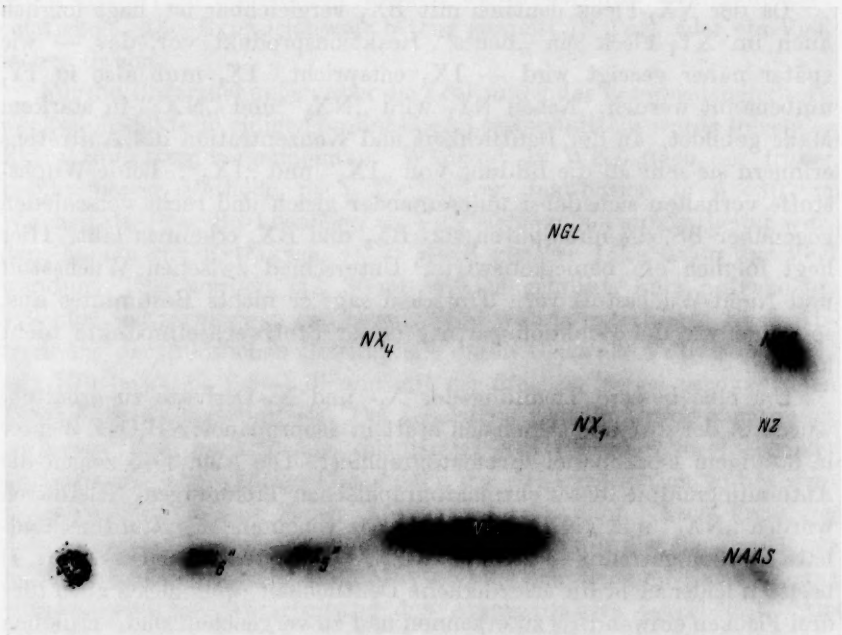


Abb. 2. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber nach Inkubation mit 6×10^{-5} m NES

Abb. 3. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber in der 2. Dimension mit 80 %igem Isopropanol chromatographiert

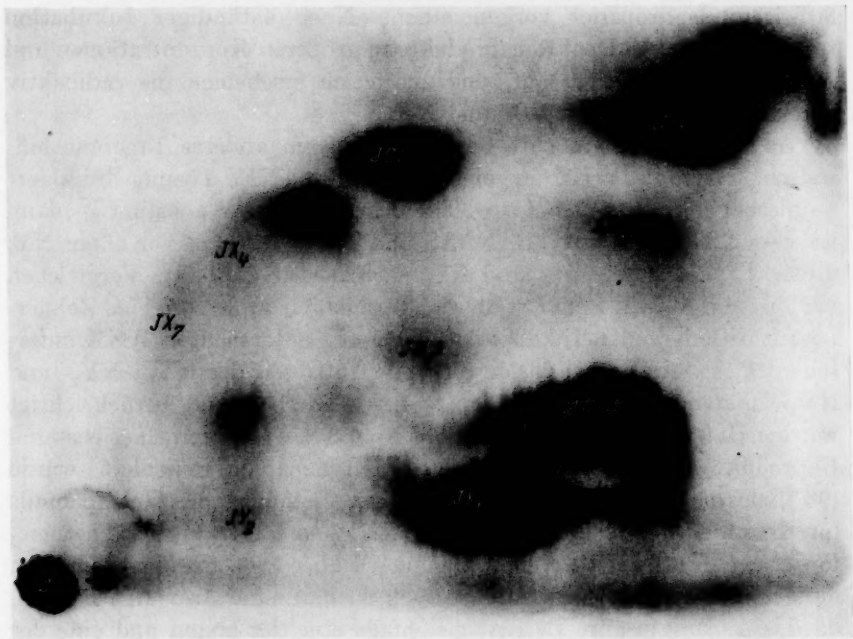


Abb. 4. Autoradiogramm wie Abb. 3, aber nach Inkubation mit 6×10^{-4} m IES

werden. Die BS (Abb. 5), die BX_5 und BX_6 nur sehr schwach zeigt (KLÄMBT 1961a), läßt nur den BX_5-Fleck, der schwer mit den entsprechenden Derivaten der NES und IES zu vergleichen ist, hervortreten.

Während der NES-Inkubation werden in den WKZ bis zu 13 chromatographisch trennbare Derivate der NES gebildet, von denen nur 5 mit jenen der BS vergleichbar sind. Für diese besteht damit auch nur geringe Wahrscheinlichkeit, daß sie in einem Zusammenhang mit der Wachstumsförderung stehen. Die übrigen Substanzen, die mit jenen der IES weitgehend übereinstimmen, können die gesuchte Beziehung zum Wachstum besitzen.

Die Arbeit geht ja von der Voraussetzung aus, daß die Wuchsstoffe aktiv in irgendwelche Stoffwechselfunktionen eingreifen und so ihre wachstumsfördernde Wirkung entfalten. Daher muß es interessieren, welche Reaktionsprodukte als erste in den WKZ gebildet werden. Aus diesem Grunde wurden Untersuchungen nach 2- und 4stündigen Inkubationen durchgeführt. Die Abb. 6 und 7 lassen deutlich erkennen, daß schon nach einer 2stündigen NES-Inkubation neben der NZ-Substanz und der NAAS sehr gut nachweisbare Mengen vor allem von NY_1, aber auch von NY_3, NY_4 gebildet worden sind. Die Identifizierung der letzten Stoffwechselprodukte wurde an den Autoradiogrammen nach Chromatographie paralleler Ansätze in der zweiten Dimension in 80%igem Isporopanol vorgenommen. Nach 4stündiger Inkubation treten die gleichen Reaktionsprodukte in größeren Konzentrationen und NY_2 nunmehr deutlich auf, und zusätzlich erscheinen die radioaktiv markierten Flecken für NGl und NX_1.

An dieser Stelle möchte ich gleich auf ein anderes Ergebnis hinweisen. Werden WKZ in einer 6×10^{-6} m NES-Lösung inkubiert — hierbei zeigen die WKZ ungefähr ihr maximales Wachstum —, dann ist nach 22 Std neben NES, NAAS und NX_1 wiederum vor allem NY_1 und NY_2, aber auch NY_4 und NY_6 nachweisbar (Abb. 8). Vergleichen wir hier die Abb. 1, 2 und 8, die sich jeweils nur in der um eine Zehnerpotenz differierenden Inkubationslösung der untersuchten WKZ unterscheiden, so stellen wir das bevorzugte Auftreten der NY_1-, NY_2- und NY_4-Substanzen in allen Fällen fest. — Hierbei muß berücksichtigt werden, daß das Chromatogramm der Abb. 8 aus Gründen einer besseren Reproduktion 8mal länger gegen Röntgenpapier exponiert wurde (96 d) als die der Abb. 1 und 2. — Diese Befunde sprechen ebenfalls für die mögliche Beziehung von NY_1, NY_2 und NY_4 zur Wachstumsförderung. Ehe wir aber nicht Genaueres über Struktur und Funktion dieser Substanzen wissen, muß es auch deshalb eine Annahme bleiben, da das Asparaginsäure-Derivat gleichfalls eine der ersten und eine der letzten Reaktionsprodukte ist, das nach NES-Inkubation in den WKZ

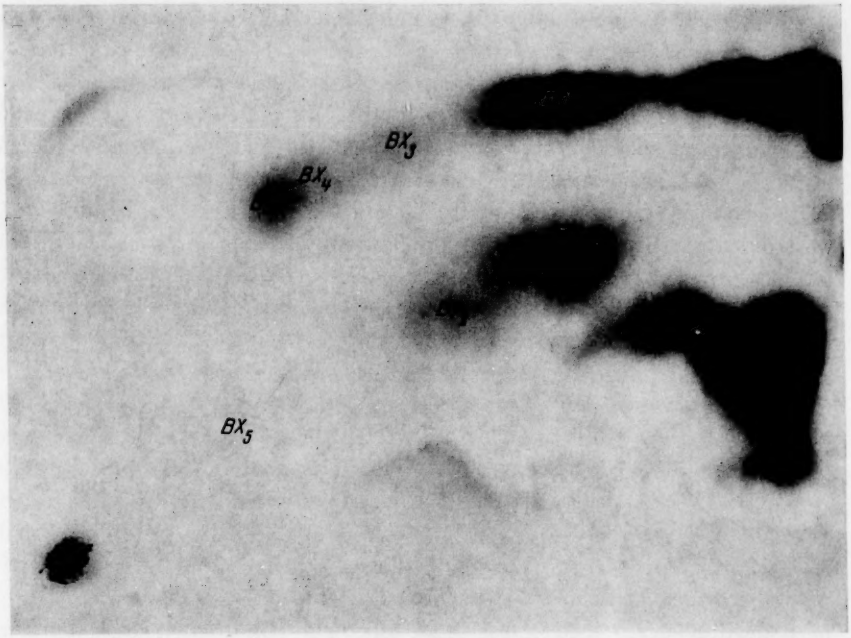


Abb. 5. Autoradiogramm wie Abb. 3, aber nach Inkubation mit 6×10^{-4} m BS

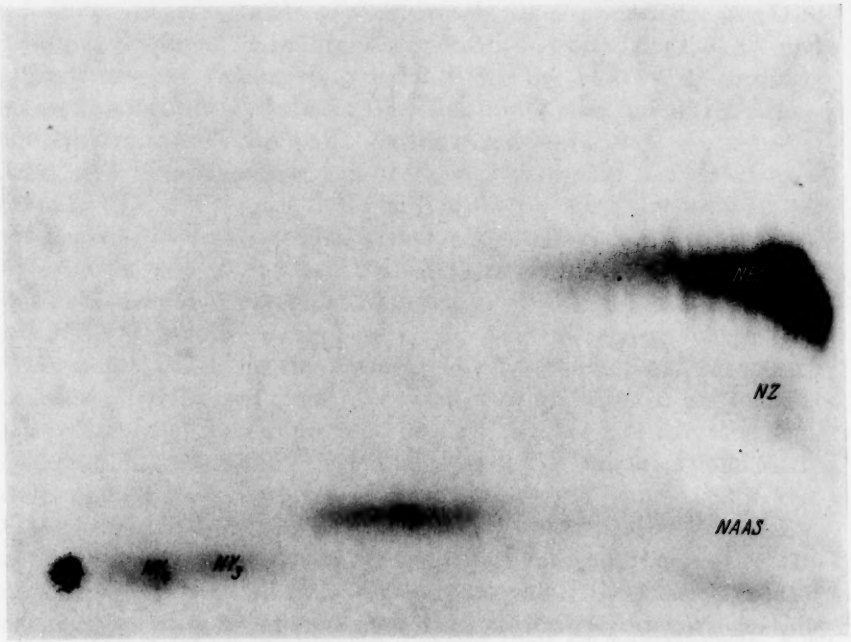


Abb. 6. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber nach 2stündiger Inkubation

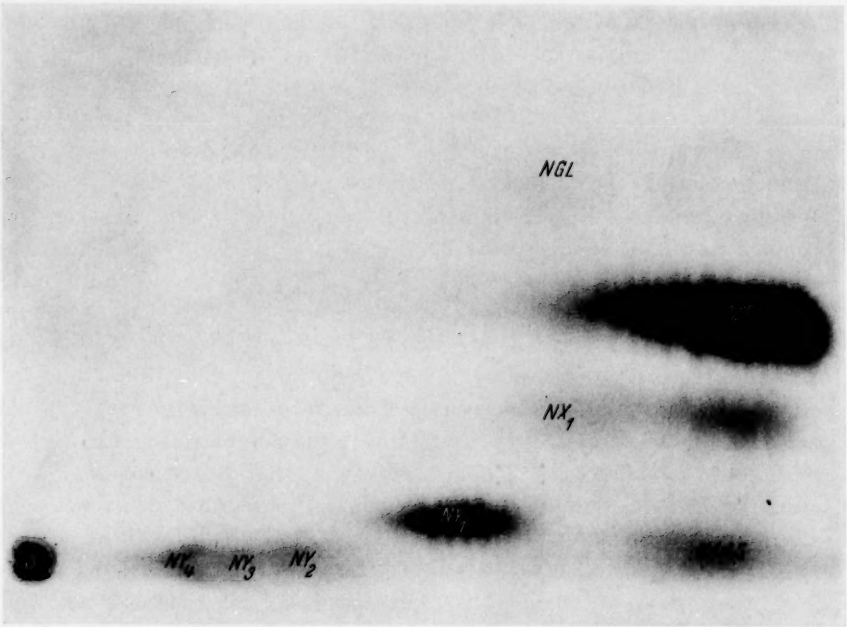


Abb. 7. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber nach 4stündiger Inkubation

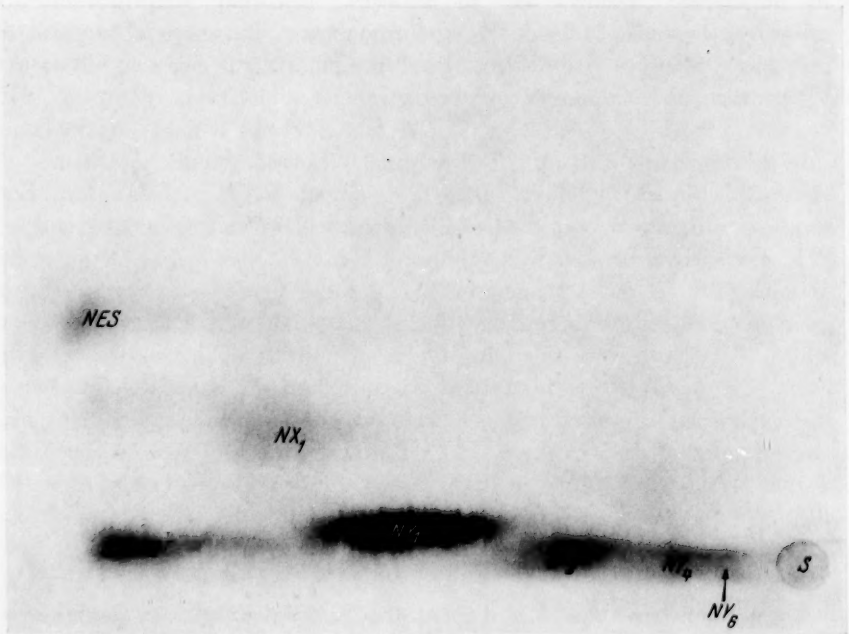


Abb. 8. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber nach Inkubation mit 6×10^{-6} m NES. (8fache Expositionszeit [96 d] gegenüber den Autoradiogrammen der Abb. 1—7)

auftritt. In der NAAS-Bildung haben wir aber sicher eine reine Entgiftungsreaktion vor uns, die zum Wachstum keine direkte Beziehung hat.

Bei IES-Inkubationen treten nach 2 Std neben IES und IAAS besonders deutlich IY_1, IY_2 und IY_4 auf. Es sind hierbei aber auch schon Spuren von IGl und nach chromatographischer Trennung mit Wasser in der zweiten Dimension auch 2-Hydroxy-Indol-3-essigsäure (2 HO-IES) nachweisbar. Nach 4stündiger Inkubation können wir für alle IES-Derivate eine Konzentrationszunahme feststellen. Auch hier treten die Y_1-, Y_2- und Y_4-Derivate besonders deutlich hervor, was die Annahme einer Beziehung dieser Substanzen zur Wachstumsförderung unterstreicht.

Nach 2stündiger BS-Inkubation sind neben BS, BGl, BAS und BX_2 nachweisbar, die nach 4stündiger Inkubationszeit die erwarteten Konzentrationssteigerungen zeigen. BX_1, BX_3 und BX_4 können erst von diesem Zeitpunkt ab aufgefunden werden. Spuren von BX_5 sind sowohl nach zwei als auch nach vier Inkubationsstunden in den WKZ vorhanden, doch steht die Menge in keinem Verhältnis zu den Y_2- und Y_4-Derivaten der NES und IES.

Um eine weitere Charakterisierung der Derivate geben zu können, wurden Untersuchungen über die Löslichkeit dieser Verbindungen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln gegenüber der salzsauren wäßrigen Phase durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle gibt hierüber Aufschluß. In geringen Mengen ist danach der Glucose-Ester der IES, NES und BS sogar in Diäthyläther löslich und ebenfalls die X_1- und Y_1-Derivate. Mit Verringerung der R_f-Werte der Stoffwechselprodukte in dem Lösungsmittel Butanol: Ameisensäure: Wasser nimmt die Äther- und Äthylacetatlöslichkeit ab. Es ist anzunehmen, daß die geringere Äther- und Esterlöslichkeit auf stärkere Hydrophilie der Substanzen schließen läßt. Daß es sich dabei möglicherweise um Kohlenhydratester verschiedener Molekulargröße handelt, ist denkbar.

Nachdem gezeigt werden konnte (KLÄMBT 1961b), daß sich die Glucose-Ester der Wuchsstoffsäuren und der BS durch Einwirken von 25% NH_4OH bei Zimmertemperatur auf dem Chromatographierpapier hydrolysieren lassen, wurde versucht, die ausreichend gut getrennten Reaktionsprodukte auf diese Weise näher identifizieren zu können. Dabei ergab sich für die Derivate des BS BX_1, BX_2, BX_3 und BX_4 eine leichte Spaltbarkeit. Die 5stündige Hydrolyse war stets quantitativ erfolgt und ergab die Radioaktivität in den BS- und Benzamid-Flecken. Die entsprechenden Ergebnisse wurden für die Substanzen IX_3 und IX_4 und NX_1 erhalten. Die Reaktionspartner dieser spaltbaren Derivate konnten bisher nicht identifiziert werden, jedoch liegt der Verdacht nahe, daß es sich dabei ebenfalls um Kohlenhydratester der Wuchsstoffsäuren und der BS handeln muß. Dagegen konnten für NY_1 und „IX_1"

unter diesen Bedingungen keine Hydrolyse erzielt werden. Darin stimmt also NY_1 mit der „IX_1"-Substanz der letzten Arbeit überein, so daß wir Grund zu der Annahme haben, daß sich diese beiden Derivate entsprechen. Deshalb wird „IX_1" in IY_1 umbenannt. Eine IX_1-Substanz, die mit NX_1 und BX_1 vergleichbar wäre, tritt in meinen Autoradiogrammen mit Sicherheit nicht auf, und wird folglich nicht oder nur in kleinsten Mengen von den WKZ gebildet.

Tabelle. *R_f-Werte der IES, NES und BS und ihrer Derivate und ihre Löslichkeit in Diäthyläther, Äthylacetat und n-Butanol*

Substanz	R_f-Werte		Diäthyläther	Äthylacetat	n-Butanol
	Butanol: Ameisensäure: Wasser	Isopropanol: NH_4OH: Wasser			
IES	0,89	0,29	+++	+++	+++
IAAS	0,79	0,06	+++	+++	+++
IGl	0,50	0,53	(+)	+++	+++
IX_3	0,34	0,58	—	+	++
IX_4	0,25	0,50	—	+	++
IX_7	0,18	0,27			
IY_1	0,62	0,03	+	+++	+++
IY_2 bis IY_9	0,25		—	?	++
NES	0,95	0,57	+++	+++	+++
NAAS	0,91	0,10	++	+++	+++
NGl	0,75	0,74	++	+++	+++
NX_1	0,76	0,37	++	+++	+++
NX_3	0,65	0,67			
NX_4	0,52	0,57	—	+	+++
NX_7	0,38	0,43			
NY_1	0,64	0,13	+	+++	+++
NY_2 bis NY_9	0,42		—	—	+++
BS	0,90	0,45	+++	+++	+++
BAAS	0,84	0,13	+++	+++	+++
BGl	0,62	0,68	+	+++	+++
BX_1	0,62	0,39	+	+++	+++
BX_2	0,49	0,26	—	+	+++
BX_3	0,41	0,50	—	+	++
BX_4	0,29	0,39	—	—	++
BX_5 und BX_6	0,24		—	—	++

2,4-D-Inkubationsversuche. 2,4-D besitzt im WKZ-Test, wie auch in anderen biologischen Testorganen, eine wachstumsfördernde Wirkung, ehe es bei hohen Konzentrationen (zwischen 6×10^{-5} und 6×10^{-4} m und darüber) stark hemmend wirkt. Darin ähnelt seine Wirkung durchaus der Wachstumsförderung, die durch NES oder auch durch IES ausgelöst wird. Um so erstaunlicher ist das folgende Ergebnis. 2,4-D wird von der Pflanze nämlich nur in sehr geringen Mengen umgesetzt, d. h. der Nachweis der für IES, NES und BS typischen und beschriebenen Reaktionsprodukte blieb aus oder war nur sehr schwach. Durch die relativ sehr schlechte Trennung in den verwandten Lösungsmitteln wird sowohl der Nachweis als auch die Identifizierung bzw. der Vergleich dieser 2,4-D-Derivate mit jenen der anderen aromatischen Säuren sehr

erschwert. Trotzdem glaube ich aus Abb. 9 die 2,4-D-Reaktionsprodukte der Asparaginsäure, der Glucose, des X_1, Y_1 und Y_2 erkennen zu können. Ganz sicher ist der Nachweis für die letzten Substanzen jedoch nicht, so daß weitere Untersuchungen an Hand eines größeren Materials, das zweckmäßig dann durch Extraktion mit Äther, Äthylacetat und n-Butanol aufzuarbeiten ist, eine Klärung bringen müssen.

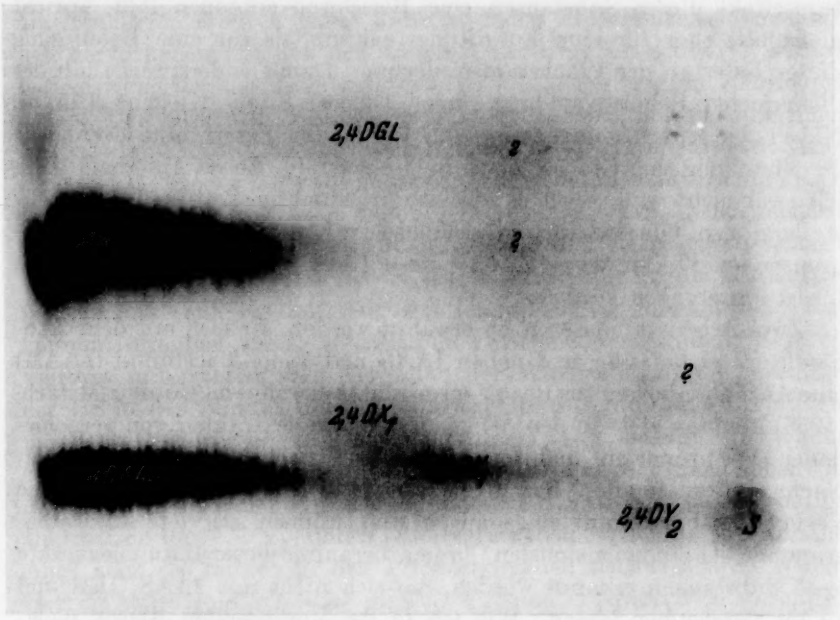


Abb. 9. Autoradiogramm wie Abb. 1, aber nach Inkubation mit 6×10^{-5} m 2,4-D. (7fache Expositionszeit [84 d] gegenüber den Autoradiogrammen der Abb. 1—7)

Diskussion

Wie für IES und BS konnte ich auch für NES und 2,4-D die Glucose-Ester in WKZ nach entsprechender Inkubation nachweisen. Quantitativ liegen jedoch große Unterschiede vor. NES bildet diese Glucose-Ester schon in weit geringeren Mengen als IES und BS, während 2,4-D nur noch Spuren davon erkennen läßt. Tabone und Tabone (1953) hatten eine entsprechende Veresterung der Indol-3-propionsäure mit βd-Glucose durch *Bacillus megatherium* nachgewiesen. In späteren Arbeiten (Tabone u. Mitarb. 1954 und D. Tabone 1955) konnten sie auch zeigen, daß Anthranilsäure — o-Aminobenzoesäure — von der höheren Pflanze mit βd-Glucose verestert wird. Auch für mein Objekt kann ich die Anthranilsäure-Veresterung mit βd-Glucose bestätigen. Für diese Reaktion haben sie ein Enzympräparat durch Phosphatpuffer- und $(NH_4)_2SO_4$-Extraktion aus Linsen-Samen erhalten und die Beteiligung von Uridindiphosphoglucose (UDPG) an dieser Reaktion wahrscheinlich machen

können. Der Nachweis dieser biosynthetischen Esterbildung sowohl für Bakterien als auch für die höhere Pflanze scheint mir auf eine recht unspezifische synthetische Leistung der Organe hinzuweisen, wie sie Entgiftungsreaktionen allgemein darstellen. Das in meinen Arbeiten sehr unterschiedliche Auftreten dieser Glucose-Ester, das weder zur gebotenen Konzentration der Wuchsstoffe und der BS noch zum Wachstumseffekt dieser Substanzen eine Beziehung erkennen läßt, spricht gleichfalls eher für eine Entgiftungsreaktion als für eine Beteiligung dieser Ester an der Wachstumsförderung. Damit widerspreche ich der diskutierten Schlüsselstellung dieser Glucose-Ester (KLÄMBT 1961b). Neben der Entgiftungsreaktion sah ich in den Estern eine eventuelle Bereitstellung von Glucose als Zellulosebaustein. Diese Annahme kann ich zwar nicht widerlegen, es scheint mir jedoch zur Zeit, daß die Bereitstellung von Glucose für die Zellulosesynthese niemals zu einem begrenzenden Faktor wird, so daß diese Ester auch keine Wachstumsförderung ergeben können.

Zwei Arbeiten müssen noch erwähnt werden, die sich mit dem IES-Stoffwechsel befassen und neben IAAS und Indol-3-acetamid (IAAM) eine Anzahl unbekannter Reaktionsprodukte erwähnen. GOOD u. Mitarb. (1956) konnten stets in den Äther- und Butanolextrakten von verschiedenen Pflanzenarten und -organen IAAM nachweisen. Der IAAM-Nachweis war für den Butanolextrakt stets kräftiger. Ohne daß die Verfasser näher darauf eingegangen sind, können aus den Autoradiogrammen der eindimensionalen Chromatogramme dieser Butanolextrakte 4—5 Substanzen erkannt werden, die sich nicht mit IAAS, IES und IAAM vergleichen lassen. Wie ich in der vorliegenden Arbeit nachweisen konnte, sind sehr viele Reaktionsprodukte der IES — s. Tabelle — in Butanol löslich, woraus das Ergebnis verständlich wird. Das gilt vor allem für die Glucose-Ester, die zwar geringfügig im Ätherextrakt enthalten sind, jedoch bei nachfolgender Ausschüttelung mit Butanol in großen Mengen darin gelöst werden. Nun habe ich in der letzten Arbeit nachweisen können, daß relativ frische Ansätze des ammoniakalischen Lösungsmittels Isopropanol:NH_4OH:Wasser diese Ester während der Chromatographie spalten. Durch Verwendung von alten Lösungsmittelansätzen konnte ich in keinem Falle IAAM nachweisen. Damit dürfte feststehen, daß der IAAM ein Artefakt darstellt. Das steht auch in Übereinstimmung mit den Erfahrungen von JEPSON (1958), der schließlich als Entgiftungsprodukt im Urin Indol-3-acetylglucuronsäure erkennen konnte, die ebenfalls IAAM durch Hydrolyse des Esters im ammoniakalischen Lösungsmittel ergab.

FANG u. Mitarb. (1959) fanden bis zu 9 Reaktionsprodukte der IES in alkoholischen Extrakten von Maiskoleoptilen und -mesokotylen und Maiswurzeln im eindimensionalen Chromatogramm. Dabei stellten sie

eine zahlenmäßige Zunahme der Reaktionsprodukte nach 19 Inkubationsstunden gegenüber 6 Std fest, was in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen steht. Nur IAAS konnte identifiziert werden, alle übrigen Stoffwechselprodukte blieben unbekannt.

Während ich in der letzten Arbeit die auftretenden Unterschiede zwischen den Reaktionsprodukten der IES und der BS kaum erwähnte und auch aus dem Vergleich von nur zwei Substanzen keine irreführenden Mutmaßungen ableiten wollte, kann ich heute einige Unterschiede deutlich hervorheben. So hat sich an Hand der Ergebnisse der NES-Inkubationsversuche klar herausgestellt, daß IX_1 der letzten Arbeit mit den X_1-Derivaten der NES und BS nicht in Übereinstimmung zu bringen ist und vielmehr das mit NY_1 vergleichbare IY_1-Derivat darstellt. Auch für 2,4-D ist das Y_1-Derivat mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen worden. Ein BY_1 wird in den WKZ mit Sicherheit nicht gebildet, so daß hierin ein sehr wesentlicher Unterschied zu bestehen scheint. Während die Glucose- und X_1—X_4-Derivate, die alle für die BS deutlich nachweisbar sind, bei den Wuchsstoffen jedoch verschiedentlich fehlen können, offenbar keine wesentlichen Differenzen aufweisen, liegt ein weiteres unterschiedliches Verhalten der Wuchsstoffsäuren gegenüber der BS in der Bildung der Y_2—Y_7-Derivate durch die WKZ vor. Die mögliche Rolle dieser Substanzen und des Y_1-Derivates für die Wachstumsförderung der Wuchsstoffe wird insofern noch unterstrichen, als die ersten Reaktionsprodukte der NES und IES nach 2- und 4stündiger Inkubation die Y_1-, Y_2- und Y_4-Derivate neben NAAS und IAAS sind. Aber auch die letzten in den Pflanzenorganen nachweisbaren Wuchsstoffmoleküle sind offenbar in Y_1-, Y_2- und Y_4-Derivaten enthalten, wie das Autoradiogramm der Abb. 8 zeigt.

Mit diesen Ergebnissen, glaube ich, ist die Grundlage für Untersuchungen über die Natur der Reaktionsprodukte und über die spezifische Wuchsstoffwirkung, die schließlich die Wachstumsförderung ergibt, geschaffen.

Zusammenfassung

Stoffwechselprodukte der Naphthyl-1-essigsäure und der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, die nach entsprechender Inkubation in Weizenkoleoptilzylindern auftreten, wurden autoradiographisch nach papierchromatographischer Trennung untersucht und mit jenen der Indol-3-essigsäure und der Benzoesäure verglichen.

1. Nach Naphthyl-1-essigsäure-Inkubation konnten bis zu 13 Reaktionsprodukte papierchromatographisch getrennt werden.

2. Wie früher für Indol-3-essigsäure und Benzoesäure bereits berichtet, tritt auch hier das Asparaginsäure- und Glucose-Derivat der Naphthyl-1-essigsäure auf, wenn auch in viel geringeren Konzentrationen.

3. Von den 13 getrennten Reaktionsprodukten der Naphthyl-1-essigsäure sind nur 5 einwandfrei mit jenen der Benzoesäure vergleichbar, die übrigen scheinen mit jenen der Indol-3-essigsäure weitgehend übereinzustimmen.

4. Bei diesem Vergleich konnte erstmals der Nachweis eines Derivates (Y_1) der Wuchsstoffsäuren geführt werden, das der Benzoesäure fehlt. Auch liegen deutliche Unterschiede im Auftreten weiterer Substanzen (Y_2—Y_7) vor, die von der Benzoesäure nicht oder nur in sehr geringen Mengen gebildet werden.

5. Neben den Asparaginsäure-Derivaten treten nach 2stündiger Inkubation vor allem die Derivate Y_1, Y_2 und Y_4 der Wuchsstoffsäuren auf, die offenbar auch am längsten im Weizenkoleoptilzylinder nachweisbar sind. Sie lassen nach einer 22stündigen Inkubation mit 6×10^{-6}m Naphthyl-1-essigsäure neben Spuren dieses Wuchsstoffes und Naphthyl-1-acetylasparaginsäure deutlich die Flecken NY_1 und NY_2 hervortreten.

6. Die quantitative Hydrolyse einiger Derivate — X_1 bis X_4 — durch 25%iges NH_4OH bei Zimmertemperatur, wie sie ebenfalls für die Glucose-Ester erzielt wurde, läßt auf weitere Kohlenhydrat-Ester schließen. Die Reaktionspartner sind zunächst noch unbekannt. Die Y_1-Derivate können unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert werden.

7. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure läßt nach entsprechenden Inkubationen nur sehr geringe Mengen verschiedener Reaktionsprodukte in den Weizenkoleoptilzylindern erkennen. Es darf als wahrscheinlich angenommen werden, daß der Glucose-Ester, die Asparaginsäure- und X_1-, Y_1- und Y_2-Derivate gebildet werden.

8. In der Diskussion wird die Glucose-Veresterung allein als Entgiftungsreaktion gedeutet und die mögliche Bedeutung der Y-Derivate und darunter vor allem der Y_1-, Y_2- und Y_4-Substanzen für die Wachstumsförderung herausgestellt.

Fräulein INGRID BLECHSCHMIDT danke ich für ihre stets sorgfältige Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährten Sachbeihilfen.

Literatur

ANDREAE, W. A., and N. E. GOOD: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. Plant Physiol. **32**, 566—572 (1957).

FANG, S. C., P. THEISEN and J. S. BUTTS: Metabolic studies of applied indoleacetic acid-1-C^{14} in plant tissues as affected by light and 2,4-D treatment. Plant Physiol. **34**, 26—32 (1959).

GOOD, N. E., W. A. ANDREAE and M. W. H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant tissues. Plant Physiol. **31**, 231—235 (1956).

JEPSON, J. B.: Indolylacetamide: a chromatographic artifact from the natural indoles, indolylacetylglucosiduronic acid and indolepyruvic acid. Biochem. J. **69**, 22 (1958).

KLÄMBT, H. D.: Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. Reaktionsprodukte der IES in Abhängigkeit von den Inkubationskonzentrationen. Planta (Berl.) **56**, 309—321 (1961a).

— Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. II. Stoffwechselprodukte der Indol-3-essigsäure und der Benzoesäure. Planta (Berl.) **56**, 618—631 (1961b).

TABONE, D.: La bioestérification du glucose: VIII. Mécanisme de la biosynthèse des esters β-glucosidiques chez les végétaux supérieurs. C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 1521—1522 (1955).

TABONE, J., et D. TABONE: Bioestérification du glucose. V. Biosynthèse par *Bacillus megatherium* de l'ester β-glucosidique de l'acide indolpropionique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **237**, 943—944 (1953).

— — et S. THOMASSEY: La biosynthèse des esters β-glucosidiques chez les végétaux supérieurs. β-Estérification du glucose par l'acide anthranilique. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **36**, 565—566 (1954).

ZENK, M. H.: Über den Stoffwechsel von Naphthylessigsäure in höheren Pflanzen. Vortrag auf der Tagg. der Dtsch. Bot. Ges., Köln, 1960.

Dr. HANS-DIETER KLÄMBT,
Botanisches Institut der Universität, Bonn a. Rh.,
Meckenheimer Allee 170

Planta 57, 354—356 (1961)

Kurze Mitteilung

Aus dem Institut für Pflanzenernährung, Bodenchemie und Bodenbiologie der Technischen Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. E. RAUTERBERG)

BLÜTENMISSBILDUNGEN AN STIEFMÜTTERCHEN DURCH PHENYLBORSÄURE

Von

HANS-OTFRIED LEH

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1961)

Vor kurzem wurde über Blütenanomalien bei Cucurbitaceen unter dem Einfluß von Phenylborsäure berichtet[1, 3]; HACCIUS und MASSFELLER haben inzwischen Morphosen dieser Art auch für Kalanchoë beschrieben[2].

Wir behandelten Jungpflanzen von *Viola wittrockiana* (*tricolor maxima*) Schweizer Riesen „Firnengold" insgesamt viermal in etwa einwöchigen Abständen mit wäßrigen Phenylborsäure (PhBS)-Lösungen (100 und 1000 ppm), die wir mittels eines Zerstäubers in Mengen von jeweils 1 ml auf die Blätter sprühten (PhBS-Menge je Pflanze insgesamt 400 γ und 4,0 mg).

Zunächst konnte weder an den vegetativen Organen noch an den zuerst gebildeten Blüten eine Reaktion festgestellt werden. Erst als die Pflanzen voll in Blüte standen (etwa 9 Wochen nach der ersten, 5 Wochen nach der letzten Behandlung), traten die erwarteten Blütenmißbildungen schlagartig in Erscheinung. Es handelte sich in den meisten Fällen um Reduktion oder völligen Ausfall von Gliedern des inneren Perianthkreises bei den Blüten der mit 4,0 mg PhBS behandelten Pflanzen, während bei den 6 Exemplaren, die nur je 400 γ PhBS erhalten hatten, nur an einer einzigen Blüte der Ausfall eines der oberen Kronblätter festgestellt werden konnte. Eine Regel hinsichtlich des Ausfalls bestimmter Petalen konnte nur insoweit festgestellt werden, als das vordere, mediane Kronblatt (die „Unterlippe") stets vorhanden und meist normal ausgebildet war. Völliger Ablast von 1, 2 oder 3 der oberen und seitlichen Petalen war ebenso zu beobachten wie morphologische Veränderungen einzelner oder mehrerer Kronblätter. In Abb. 1 sind einige der auffälligsten Aberrationen wiedergegeben.

Abb. 1. Normal (a) und anomal (b—f) ausgebildete Blüten von *Viola wittrockiana*, die mit PhBS (4,0 mg/Pflanze) behandelt worden waren

Abb. 2. Dreispornige Blüte von einer mit 4,0 mg PhBS behandelten *Viola wittrockiana*. Der Sporn der „Unterlippe" liegt oberhalb der Aufnahmeebene, die beiden Sporne der seitlichen Petalen sind deutlich zu erkennen. (Eines der beiden oberen Kronblätter ist ablastiert)

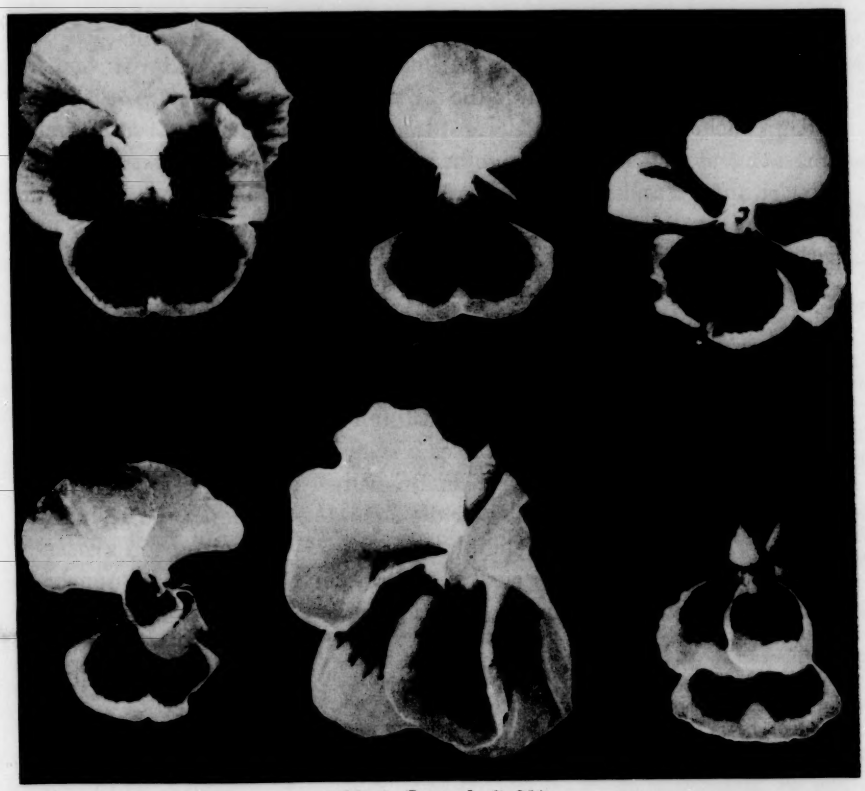


Abb. 1. (Legende S. 354)

Abb. 2. (Legende S. 354)

Besonders interessant dürfte die Feststellung sein, daß in mehreren Fällen die Anzahl der gespornten Petalen vermehrt war: Während bei der normalen Viola-Blüte nur die „Unterlippe" einen Sporn ausbildet, in den hinein die beiden vorderen Stamina je einen nektarabsondernden Fortsatz entsenden, war bei einer ganzen Anzahl der durch PhBS-Einwirkung veränderten Blüten außerdem eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte spornartige Aussackung an einem oder auch an beiden seitlichen Kronblättern vorhanden. Abb. 2 zeigt eine Blüte mit insgesamt 3 wohlausgebildeten Spornen. In einem Falle wurden in den beiden seitlichen Spornen einer dreispornigen Blüte je ein funktionsfähiges Nektarium als Anhängsel der seitlichen Staubblätter (zusätzlich zu den beiden Nektarien im Sporn der „Unterlippe") gefunden. Andererseits fehlten bisweilen bei PhBS-Blüten die Nektarien im Sporn des medianen Kronblattes völlig oder es war nur ein Nektarium vorhanden.

Der Kelch war bei den durch PhBS-Einwirkung veränderten Blüten z. T. normal ausgebildet, z. T. war die Zahl der Sepalen auf 3 reduziert; petaloide Ausbildung von Kelchblättern sowie Verwachsungen zwischen Antheren und Petalen, wie sie bei den früher untersuchten Cucurbita-Blüten häufig waren[3], wurden bei Viola nur in einigen wenigen Fällen beobachtet.

Die Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Literatur

[1] Haccius, B., u. D. Massfeller: Durch Phenylborsäure induzierte Reduktion der Petalen bei *Cucumis sativus*. Naturwissenschaften **46**, 585—586 (1959).

[2] — — Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Phenylborsäure. Planta (Berl.) **56**, 174—188 (1961).

[3] Leh, H.-O.: Chemomorphosen an Blüten von *Cucurbita pepo*, hervorgerufen durch Phenylborsäure. Naturwissenschaften **48**, 138—139 (1961).

Dr. Hans-Otfried Leh,
Institut für Pflanzenernährung, Bodenchemie und Bodenbiologie
der Technischen Universität Berlin,
Berlin-Dahlem, Lentze-Allee 55/57

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

II. Formelle Anforderungen

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungs-Vorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse anzufügen. Eine Übersetzung dieser Zusammenfassung in eine andere der Kongreß-Sprachen kann in Petit-Druck hinzugefügt werden, sofern beide Zusammenfassungen nicht mehr als insgesamt $1^1/_2$ Druckseiten beanspruchen.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Handbuch der Pflanzenphysiologie
Encyclopedia of Plant Physiology
Herausgegeben von W. RUHLAND†
In Gemeinschaft mit
E. ASHBY, Belfast · J. BONNER, Pasadena · M. GEIGER-HUBER, Basel · W. O. JAMES, London · A. LANG, Pasadena · D. MÜLLER, Kopenhagen · M. G. STÅLFELT, Stockholm
In 18 Bänden

Ende Oktober 1961 wird erscheinen:

Band 14

Wachstum und Wuchsstoffe
Growth and Growth Substances

Bearbeitet von B. ÅBERG, F. T. ADDICOTT, L. J. AUDUS, J. A. BENTLEY, R. BLOCH, J. BRACHET, H. BURSTRÖM, P. CHAMPAGNAT, R. CLELAND, A. S. CRAFTS, N. FRIES, A. W. GALSTON, S. A. GORDON, C. J. GORTER, F. G. GUSTAFSON, E. HEITZ, T. HEMBERG, W. S. HILLMAN, S. HOUSLEY, A. HOWARD, N. Å. JÖNSSON, A. LANG, P. LARSEN, A. C. LEOPOLD, R. A. LEWIN, J. VAN OVERBEEK, B. O. PHINNEY, P.-E. PILET, R. POHL, R. D. PRESTON, U. RUGE, G. SCHRAMM, H. SÖDING, J. STRAUB, J. H. TAYLOR, C. THIELKE, C. A. WEST, W. G. WHALEY, D. J. WORT, H. ZIEGLER

Redigiert von HANS BURSTRÖM, Lund/Schweden

Mit etwa 376 Abbildungen. Etwa 1420 Seiten (16 Beiträge in deutscher, 35 Beiträge in englischer und 4 Beiträge in französischer Sprache) Gr.-8°. 1961.

Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 284,—
Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 355,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis bis zum Abschluß des Werkes; jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich

INHALTSÜBERSICHT

Einführung und Übersicht · General survey · Anatomische Grundlagen des Wachstums · Wachstum als Gesamtprozeß · Die einzelnen Wachstumsprozesse · Die chemische Regulierung des Wachstums: General survey. Metabolic factors limiting growth. Die Auxine. Other biogenous growth promoters. Biogenous inhibitors. Gibberellins and plant growth · Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis · Namenverzeichnis — Author Index · Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch) — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany